

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**

**Departamento de Física de la Tierra, Astronomía y Astrofísica I (Geofísica y Meteorología)**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización higroscópica del aerosol atmosférico  
mediante la técnica lidar Raman**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Alfonso Javier Fernández García**

DIRECTORES:

**Manuel, dir Pujadas Cordero  
Francisco, dir Molero Menéndez**

**Madrid, 2015**

5329971469  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FER  
car



Caracterización de los genes *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB:  
Descripción de una nueva ruta para la degradación anaeróbica  
de compuestos aromáticos

TESIS DOCTORAL

JAVIER FERNÁNDEZ JUÁREZ



R.140516611

Madrid, 2011



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

Caracterización de los genes *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB:  
Descripción de una nueva ruta para la degradación anaeróbica  
de compuestos aromáticos

**JAVIER FERNÁNDEZ JUÁREZ**

**DIRECTORES:**

**Dr. EDUARDO DÍAZ FERNÁNDEZ**

**Dr. MANUEL CARMONA PÉREZ**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**



**Madrid, 2011**



*“¡Oh amigos!, ¡Sed hombres, mostrad que tenéis un corazón pundonoroso, y avergonzaos de parecer cobardes en el duro combate! De los que sienten este temor, son más los que se salvan que los que mueren; los que huyen, ni gloria alcanzan ni entre sí se ayudan.”*

*Iliada*, canto XV (verso 561)  
Homero (S. VIII a. C.)

*“...muchas [...] cosas, si se las considera aisladamente, están lejos de ser bellas, y sin embargo, al ser consecuencia de los fenómenos naturales, cobran un aspecto bello y nos cautivan...”*

*Meditaciones de Marco Aurelio*, Libro III (2)  
Marco Aurelio (121-180 d. C.)

*“...considerando que aquel que codiciare el honor por premio de la ciencia, no debe despreciar ni huir el trabajo con el que se consigue; y que el ignorar el hombre lo no forzoso, no arguye culpa notable; pero el no saber lo necesario, es desprecio de sí mismo; y sobre todo, que es torpeza de ingenio y falta de valor perder la esperanza de alcanzar aquello que cabe en la posibilidad de ser alcanzado.”*

*Modo fácil y nuevo para examinarse los maestros en la Destreza de las armas* (pg. 13)  
Luis Pacheco de Narváez (1570-1640 d. C.)

*“Y ahora ya sin bárbaros ¿qué será de nosotros? / Esos hombres eran una cierta solución”*

*Esperando a los bárbaros*  
Constantino P. Cavafis (1863-1933 d. C.)



*A MIS PADRES*  
*A MI HERMANO*  
*A ISABEL*



# AGRADECIMIENTOS

El verano de 2006 se extinguía en un último crepúsculo vacacional e Isabel y yo nos trasladábamos a Madrid para comenzar una nueva fase de nuestra vida. En aquel trayecto comencé a pergeñar una lista compuesta por toda la gente que me había ayudado a iniciar aquel viaje, una lista que a lo largo de los años se ha enriquecido con multitud de nombres sin los que hubiera sido imposible el desarrollo de la Tesis Doctoral que aquí se presenta, tanto por su aportación científica como personal.

Todo viaje comienza con un primer paso, por lo que comenzaré mencionando a las personas gracias a las cuáles llegué al grupo de Biotecnología Medioambiental del CIB. Así pues, en primer lugar me gustaría agradecer su ayuda a los Doctores Miguel Ángel Ferrero, Leandro Rodríguez y Honorina Martínez (Nori) del Departamento de Bioquímica, y al Dr. Jose Luis Acebes del departamento de Fisiología Vegetal, ambos de la Universidad de León. Quiero agradecerles sus continuos consejos y enseñanzas a lo largo de mis estudios de Biología. Gracias a nuestras conversaciones adquirí una visión certera de la naturaleza de la Ciencia y de las opciones existentes para el desarrollo de una carrera científica. Ellos contribuyeron a estimular la confianza en mi mismo y a garantizarme que para alguien inquieto siempre habría un lugar en el que investigar, sin su apoyo no habría tenido brújula en este viaje. Gracias a los doctores Ferrero y Rodríguez contacté con el Dr. Baltasar Miñambres (Balta) de la EAE-CSIC, del que resalto su incomparable calidad humana y su capacidad de inventiva y sacrificio, así como la recomendación de que contactara con el grupo en el que he desarrollado mi trabajo predoctoral. Con ellos conservo una amistad que perdura a lo largo de los años.

Recuerdo la entrevista con José Luis, Eduardo y Auxi una tarde de Mayo, bajo la adusta mirada del busto en bronce del Don Jaime Ferrán. En Septiembre nos incorporábamos al grupo, muchas gracias por confiar en nosotros. En este punto quiero hacer un primer alto en el camino para mostrar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Eduardo y Manuel. Muchas gracias por enseñarme a hacer Ciencia de calidad, a pensar como un científico, a leer mucho y a plantear diseños experimentales impecables. Si a partir de ahora soy capaz de seguir mi camino en esta carrera es gracias a vosotros. Gracias Eduardo por las rondas diarias, por tu saber enciclopédico (ganarías a Deep Blue en un concurso de plásmidos), por poner todas tus capacidades al servicio de cada duda que te consultamos, gracias por ser un gran maestro. Gracias Manuel por tus puntos de vista alternativos, por la larga lucha con *Geobacter*, por tu visión holística de la Ciencia, gracias por saber distender con una buena conversación los momentos en los que la concentración se convierte en ofuscación. Muchas gracias José Luis por todas las ocasiones en las que en un momento generas toda una colección de posibilidades, gracias por aportar constantemente ideas y proyectos. Gracias Auxi por tus consejos y por las charlas a la puerta de tu despacho del 343.

Recién llegado al laboratorio me acogió bajo su ala la mamá pato mejor que uno pudiera desear. Muchísimas gracias Tere, sin ti no habría Tesis. No sólo eres una arrojada pionera sino una magnífica malabarista capaz de mantener en el aire un gran número de proyectos. Gracias por enseñarme a darle valor a todos los aspectos del día a día del laboratorio, hasta los más prosaicos. La frase manida de que si no existieras habría que inventarte se queda corta, con los pedazos de tu molde que quedaron tras romperlo se podrían fundir mil investigadores como yo.

Me gustaría hacer una mención especial a los líderes del grupo de Genética Bacteriana, vulgo Pneumo, del CIB. Gracias Pedro por los consejos y tertulias al amor de un café y una naranja, espero que algún día asimiles mis preferencias futbolísticas (*Aliquando bonus dormitat Homerus*). Muchas gracias Ernesto por tener siempre abierta la puerta de tu despacho, por prestarte siempre a discutir cuestiones de cualquier materia (Ciencia, lengua, el mundo...) y por dejarme entrever tu inmensa sabiduría, ah, y gracias por el bien intelectual que me has hecho a base de Ciencia Ficción de calidad. Tampoco quiero olvidarme de Rubén, gracias por poner los cimientos de este gran grupo humano.

Volviendo al hilo principal de la historia, una vez alistado en las filas del CIB comencé a conocer a las personas y personajes que pueblan los laboratorios de Pneumo y Biodegradación, la fiel infantería aún conocida por los campos de batalla de la Ciencia, y de las fiestas planeadas y sin planear, como "los Rubenes". Durante unos meses breves pero intensos tuve el honor de

coincidir en el 342 con “el Niño”, encargado oficial de las dudas Quimicefa y extraordinario consejero. También me encontré allí con nuestros dos extremeños universales, Blas y Juan. Nadie como Blas para enseñarme los rituales del laboratorio en los que la Ciencia es hermosa, nadie como él para romper el hielo con un tema de conversación (he reservado tu regalo para el día de la defensa). A Juan le agradezco especialmente su infinita paciencia para atender mis dudas de novato y los paseos cuesta arriba camino a casa arreglando la Ciencia. Y hablando de paciencia la de María, a la que nada más llegar robé la mitad de la exigua esquinera que ocupaba para montar mi “oficina”, gracias por tu buen hacer en el laboratorio y tu capacidad para escuchar en cualquier conversación. El equipo del 342 lo cerraba Gonn, inigualable maestro e incomparable amigo, gracias por todo, por tus consejos en la Ciencia y por compartir conmigo el “Síndrome CIB”, que obliga a dilatar adrede los últimos experimentos del día para polemizar sobre lo divino y lo humano (literalmente), gracias por ser la hipotenusa que une a este cateto que ahora escribe, y a otro que mencionaré más adelante, en el triángulo más temido y desastre del 342 (gracias Saray y Samuel por aguantar la locura de este elemento). Gracias también a Gaëlle y Noa por mantener a Gonn con los pies en la tierra y evitar que el físico de corazón de oro salga volando a contar nubes.

En el 343 me encontré con dos melenas revolucionarias, una color ala de cuervo y otra rubia. Gracias Laura por los consejos sobre el  $^{14}\text{C}$ , por retroalimentarnos en el gusto por los zombies, la épica..., y por orientarme para que siga los tortuosos caminos del metal. Gracias Isa por ayudarme a distinguir la infinita variedad de amarillos que puede existir en un  $\beta$ -gal y por las charlas camino a Cuatro Caminos. En el 343 también habitaba una Dra. capaz de enseñarte los arcanos de los experimentos *in vitro* y de ayudarte a mantener una mentalidad positiva ante fracasos conocidos y por conocer, gracias Bea. La alineación titular del “laboratorio de las niñas” la cerraba Merche, la técnico-madre más alegre de todo el CSIC.

No me olvido de los Pneumos que había a mi llegada. Allí estaba Dani Lull, el doctor-actor, o viceversa, más polifacético y atento del universo mundo. También estaba Miriam, a la que agradezco especialmente nuestras charlas al servirnos una taza de humeante café y el que siempre aporte su punto de vista. A Ana G. le agradezco su disponibilidad absoluta cuando necesitaba su ayuda y que conservara su sonrisa las largas noches de laboratorio. Gracias Elo por tu atención y ayuda.

Un capítulo aparte entre los veteranos se lo dedico a Iria, la pionera de los *Mycobacterium* y del 344. Gracias por estar siempre ahí, por tener siempre tiempo para una charla con el Sol y los resultados dándonos en la cara, por las frases certeras y por las fiestas a la luz de la medianoche sueca.

A continuación proseguiré con la gente que entró en el laboratorio conmigo y con la que se ha ido incorporando durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Gracias Vir por ser la alegría del 343, la zurdita que llena mi cupo diario en ausencia de mi hermano y por tener una de las sonrisas capaces de infundir más ánimo. Gracias Ana V. porque esta Tesis sin ti sería materialmente imposible, por tu inmensa capacidad de trabajo y tus ansias de aprender, gracias también por los momentos de confianzas, especialmente en nuestro, desgraciadamente, tema favorito. Gracias Miri por las tardes de Coca-Cola y charla, gracias por estar siempre dispuesta a tender la mano y ofrecer el consejo apropiado, tu opinión siempre es tenida en cuenta. Gracias Nina por tu dulzura y tu mirada franca, gracias por aguantar mis discursos sobre historia de España y por tu afán de hacer grupo en las más variopintas actividades. Ahora viene el cateto restante del triángulo, mi hermano de batalla en el campo del honor de los *Azobars*. Gracias Andrés por intercambiar conmigo los papeles de caballero y escudero en cada experimento, por empuñar codo con codo las pipetas en la trinchera del día a día, gracias por tus vaciles en el laboratorio y fuera de él, gracias por ser un gran amigo. Gracias Valle por hacernos ver la Ciencia con exactitud y, mucho más importante, a ver la vida con alegría y optimismo, gracias por hacernos asociar tu melena rizada al amanecer de una sonrisa en el laboratorio. Gracias Elisa por tu amabilidad y por acordarte siempre de preguntar un “¿Qué tal va esa tesis?”. Gracias Susana por tu insondable paciencia y por aportar siempre tu experiencia y punto de vista respecto a la solución de nuevos problemas. Gracias Yuste por tu sentido del humor (desafortunadamente para ti tengo en mi poder vídeos que podrían hundir tu carrera política si un día tuviera lugar) y tu espíritu de grupo. Gracias Violeta por tu misión para tratar de desenganchar a este drogadicto reconocido del café y por acordarte de mí en los momentos más



difíciles. Gracias Jose Ramos, Dr. Perrea, por tus consejos, por ser lo máximo, por *a lot of ketchup*, por A-M-I-G-O y por seguir contando con nosotros cada vez que vienes a Madrid. Gracias María del Mar por alegrarnos el día con tu sonrisa angelical, el laboratorio no es el mismo sin tus tirabuzones rubios y tus suspiros a última hora. Gracias Esther por continuar el espíritu de unidad del grupo y por luchar por el orden del laboratorio, gracias por aguantar mis largas divagaciones a tus preguntas concretas y por transmitírnos a todos tu constancia. Gracias Beatriz Piñeiro por las tardes de conversaciones apresuradas sobre libros y juegos.

En estas líneas he revivido recuerdos de muchos compañeros que, guiados por los jefes, forjaron el espíritu de este grupo. Pero la rueda del tiempo no cesa nunca de girar y las despedidas e incorporaciones son continuas. A continuación mostraré mi gratitud a la autobautizada *New Generation*, a la que animo a mantener el alma que ha hecho único a este laboratorio. Gracias Julia por apuntalar a la colonia leonesa y por tratar de integrarte desde tu primera visita. Gracias Loreine por proporcionar consejos científicos desde puntos de vista alternativos y por tu optimismo impenitente respecto a la finalización de esta Tesis. Gracias Carlos por tu ingente trabajo con el genoma de CIB que nos facilita la vida a todos, gracias por tus interesantes tertulias musicales y tus ánimos constantes. Gracias Roberto por tu franqueza y tu iniciativa para liarla en un minuto. Gracias Zulema por tu ayuda bioinformática, por tu sabiduría épico-bibliófila y por el infinito interés por el día a día de los becarios. Gracias Carmen por tu saber estar y prudencia constantes y por contagiarnos tu valor ante las empresas difíciles. Gracias Zaira por traer aires nuevos al 342, por tolerar mi imperialismo en la poyata y por ser una encantadora caja de sorpresas. Gracias Fernando por tu sentido del humor, tus conocimientos analíticos y por el valor de trabajar en el gineceo del 344. En este apartado también quiero dar gracias a Begoña, ya que si bien es veterana no he tenido la fortuna de coincidir con ella más tiempo, muchas gracias por tu apoyo en situaciones complicadas.

No me olvido de las aves de paso con las que he compartido momentos en el laboratorio: Marta Tortajada, Ignacio, Dani, Marta Rojo (*spicy*), Stephanie, Joana, Serena, Rocío (te debo unas procesiones), Nico... Muchas gracias a todos, vuestro paso por el laboratorio ha dejado, y dejará, huella.

Más allá del ala ocupada por pneumos y biodegradadores también habitan, o habitaron, muchas personas con las que estoy en deuda. Gracias Luque por ser sencillamente genial, aportando la anécdota precisa en el momento adecuado. Gracias Rodri y Carlos porque sin vosotros los becarios despistados del centro, como un servidor, nunca nos hubiéramos conocido en un ambiente distendido y carnavalesco, nunca me olvidaré de los grandes momentos vividos con vosotros y gracias a vosotros. Gracias a los excepcionales compañeros de FEMS 2009: Fátima, Eli y el sin par Ramón. Gracias a todos los demás pobladores del centro, incluyendo a los futboleros: Marta Fierro (¡viva Redilluera!), Javi Gyarre, Leo, Rafa, Carlos, Rubén, Amaya, Asier... Gracias Ana.

En el aspecto científico quiero mostrar mi agradecimiento a todos los servicios del CIB (incluyendo a Secugen), y muy especialmente a Carlos Alfonso Botello (servicio de Ultracentrifugación Analítica) y a Mario Lacoba (servicio de Informática).

Fuera del CIB pero dentro del CSIC he de dar las gracias a los doctores Víctor Parro y Manuel Gómez por su ayuda en el proyecto de secuenciación de *Azoarcus* sp. CIB.

Un apartado especial lo ocupan las personas que componen el grupo de trabajo de la Universidad de Leipzig (Alemania) dirigido por el Profesor Matthias Boll, en el cual tuve el privilegio de disfrutar de una estancia de tres meses. Gracias Matthias por acogerme como uno más, por tu interés y dedicación y por tener siempre un rato de esparcimiento para intercambiar opiniones. Gracias a todos vosotros que me aceptasteis dentro y fuera del laboratorio desde el primer día, con los que tuve más contacto como Kevin Kuntze (solucionador de problemas oficial), Johannes Kung (estimulador de mi vida social en Alemania), Jana (siempre pendiente y atenta, una amiga), Simon (gracias por tu paciencia), Christian (sin tu trabajo esta tesis hubiera sido imposible), Jose (el becario más trabajador del mundo), Sebastian Sauter y Steffen (siempre dispuestos a echar una mano), Alex (historiador oficial del laboratorio), Agnieszka (tengo pendiente una visita a tu país), Jorg (¡ánimo en tu camino!) y con los que tuve menos contacto como Christina, Sebastian, Claudia, Siegrid y Tobias. También me gustaría mostrar mi agradecimiento a las personas de la residencia que me hicieron la vida más fácil: Pezhman, Arianna, Vaida, Christina, Sukhu, Cihan, Asha, Lars, Ricardo, Mélissa...

En otro orden de laudatorios quiero dar las gracias a mis hermanos de armas de la Asociación Española de Esgrima Antigua (AEEA), gracias a cuya compañía mi mente ha abandonado el laboratorio unas horas cada semana. Gracias al Maestro Alberto Bompreszi por hacer que esta organización sea posible, porque devolver el honor y el esfuerzo a la España del siglo XXI es una nueva forma de aguantar las quince cargas de los suecos en Nördlingen. Gracias al resto del cuerpo técnico: Óscar Torres, Rorro, Marc, Cat, Óscar López, Rosa, Juan Carlos... Un agradecimiento especial para el Señor Luis Miguel Palacio, al que debo la cita del Siglo de Oro que aparece al comienzo de esta Tesis. Gracias a los tres mosqueteros con los que hice cuarteto nada más llegar a la sala: Germán (tan buen conversador como generoso e incomparable amigo), Víctor (¡suerte en las lejanas tierras, valiente!) y Héctor (diseñador de espadas, ingeniero en ciernes... ¡un partidazo!). Muchas gracias a todos, y os ruego disculpéis a todos los que me dejo en el tintero: Sixto, Cózar, Jaime León, Jaime Carbó, Gabriel, Carnicero, Juanma...

De vuelta a mi patria chica voy a proseguir los agradecimientos con mis amigos de toda la vida en la capital del viejo Reino. Gracias al “Núcleo Duro” que me ha ayudado a ser como soy. Gracias Aldonza por tantos años de confidencias, charlas a media voz, cafés y amistad con mayúsculas. Gracias Eduardo por casi un cuarto de siglo de amistad, por ser tan auténtico y por estar siempre ahí. Gracias Aitor por los “¡orko!”, las cervezas y acciones de comando compartidas y por conseguir siempre estirar el tiempo sea como sea para tomar algo juntos. Gracias Pablo por tu apoyo, especialmente en la gloriosa época del instituto, y por ofrecerte constantemente como sujeto experimental. Gracias García por mantener el contacto a lo largo de los años y acordarte siempre de hacer una llamada en el momento oportuno. Gracias Guillermo por hacer que cada vez que nos vemos parezca que no lo hacemos desde hace una centuria. También quiero agradecer a Bea la amistad compartida durante lustros y los emails que nos mantienen en contacto. Gracias Ángel y Feli por vuestra amistad y por vuestro interés para acoplarlos a nuestros horarios de científico para sacar un rato y cenar juntos. Gracias Ana Belén y Javi por vuestra grata y continuada amistad. Muchas gracias a todos los que por falta de espacio no puedo incluir aquí, gracias a vosotros que contribuís a que en mi cabeza sólo asocie buenos pensamientos a León: Larry, Raquel...

También en León mi gratitud se dirige a mis compañeros de carrera, un grupo heterogéneo e incomparable. Gracias Rosalía por los paseos camino a la Facultad arreglando el mundo. Gracias Lety por esa sonrisa que hacía que un examen fuera sólo un examen. Gracias Alma por tus esfuerzos para reunirnos a todos con la excusa de una partida de Risk. Gracias Tessier por ser todo un caballero y por enseñarnos a todos el valor de la superación (¡un beso Lola y Pablo!). Gracias Nacho por tantas tardes compartidas a base de tomar apuntes y capuchinos de máquina. Gracias Pablo Fuertes por conformar conmigo la extraña pareja abstemia de Biología. Gracias Pablito y Héctor por hacerme olvidar los artrópodos con numerosas tardes de fútbol. Gracias a todos: Dani, Luis, Helena, Nerea, Cueva, María de Godos, Diana, Marta...

Gracias a mi familia. Gracias Papá y Mamá por inculcarme el valor del esfuerzo, por animarme siempre a dar un paso más, por todos vuestros sacrificios y desvelos, muchas gracias por entender mi vocación y estimularla desde tiempos tan lejanos como cuando en 2º de EGB Don Jesús me empezó a llamar “el científico”. Gracias por vuestro infinito amor y paciencia, si esta tesis busca que alguien esté orgulloso, esos sois vosotros. Gracias a mi hermano David porque por él entiendo a los Dioscuros, por hacerme sentir orgulloso cada día y por aguantar a esta calamidad de hermano mayor. Gracias a mis abuelas Carmen y Mercedes por estar siempre preocupadas, gracias por vuestra sabiduría y por vuestro cariño. Quiero agradecer de forma general a todos mis tíos y primos su apoyo constante, os ruego me perdonéis, pero si os citara a todos y todo lo que os debo esta tesis tendría que tener otro título, muchas gracias a todos. Gracias Paco y Esmeralda por darme a Isabel. Gracias Isabel, por todo. Gracias por convencerme para iniciar esta aventura. Gracias, porque haber sido compañera de carrera, y ahora ser compañera de laboratorio y novia a la vez es un asunto complicado que manejas perfectamente. Gracias por ser el ancla que me mantiene en contacto con un mundo al que das sentido, gracias, porque cada vez que oigo tu voz, creo que Dios creó al Mundo con la palabra.

Gracias a todos los que ya no estáis ente nosotros, por cada uno de vosotros hay una butaca vacía, gracias por ayudar a construir lo que de bueno pueda haber en mí.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

v

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La biodegradación de compuestos aromáticos</b>	<b>3</b>
1.1. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos	5
1.2. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	6
1.2.1. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	10
1.2.1.1. Activación de ácidos orgánicos aromáticos con tioésteres de CoA: rutas anaeróbicas y rutas híbridas	10
1.2.1.2. Actividades CoA ligasa	11
1.2.2. Rutas centrales del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	13
1.2.2.1. Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA	13
1.2.2.2. Genética de la ruta central del benzoil-CoA	19
<b>2. Regulación de la expresión de los genes responsables de la biodegradación anaeróbica de compuestos aromáticos</b>	<b>23</b>
2.1. Regulación específica de efector	26
2.1.1. Regulación de <i>cluster bad</i> de <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	26
2.1.2. Regulación del <i>cluster bzd</i> de <i>Azotarcus</i> sp. CIB	28
2.1.3. Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos	29
2.1.3.1. HbaR ( <i>Rhodopseudomonas palustris</i> )	29
2.1.3.2. TdiSR ( <i>Azotarcus</i> y <i>Thauera</i> spp.)	30
2.2. Regulación sobreimpuesta	31
2.2.1. Regulación dependiente de oxígeno	31
2.2.2. Regulación dependiente de fuentes de carbono alternativas (represión catabólica)	33
<b>3. La degradación anaeróbica de tolueno y <i>m</i>-xileno</b>	<b>35</b>
3.1. La degradación anaeróbica de tolueno	35
3.2. La degradación anaeróbica del <i>m</i> -xileno	38
3.3. La ruta central del 3-metilbenzoil-CoA	38
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos</b>	<b>47</b>
<b>2. Medios y condiciones de cultivo</b>	<b>52</b>
2.1. Medios de cultivo empleados para <i>Escherichia coli</i>	52
2.2. Medios de cultivo empleados para <i>Azotarcus</i> sp. CIB	53
2.3. Antibióticos	54
2.4. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo	54
2.5. Condiciones de cultivo	55
2.6. Conservación de las cepas bacterianas	56
<b>3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA</b>	<b>56</b>
3.1. Purificación de DNA	56
3.2. Purificación de RNA	56
3.3. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)	57
3.4. Secuenciación de DNA	57
3.4.1. Secuenciación automática	57
3.4.2. Secuenciación manual	57

3.5.	Determinación del sitio de inicio de la transcripción	57
3.6.	Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR)	58
4.	<b>Experimentos de transferencia genética</b>	59
4.1.	Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> mediante choque térmico y electroporación	59
4.2.	Transformación de células de <i>Azoarcus</i> sp. CIB mediante electroporación	60
4.3.	Transferencia de plásmidos mediante conjugación	60
4.3.1.	Protocolo de conjugación	60
4.3.2.	Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	61
5.	<b>Técnicas de manipulación de proteínas</b>	61
5.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	61
5.2.	Sobreproducción y purificación de proteínas	62
5.2.1.	Sobreproducción y purificación de MbdW-His <sub>6</sub>	62
5.2.2.	Sobreproducción y purificación de MbdR-His <sub>6</sub>	63
5.3.	Cromatografía de gel-filtración	63
6.	<b>Ensayos de actividad enzimática</b>	64
6.1.	Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa	64
6.2.	Ensayos de actividad CoA-ligasa	64
6.2.1.	Ensayo directo	65
6.2.2.	Ensayo indirecto (acoplado)	65
6.3.	Ensayos de actividad (3-metil)-benzoyl-CoA reductasa	66
6.4.	Ensayos de actividad (metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa	67
6.4.1.	Ensayo mediante HPLC	67
6.4.2.	Ensayo espectrofotométrico	67
7.	<b>Ensayos de unión de proteína a DNA</b>	68
7.1.	Marcaje de sondas radiactivas	68
7.2.	Ensayos de retardo en gel	68
7.3.	Ensayos de protección frente a digestión con DNasa I ( <i>footprinting</i> )	69
7.4.	Ensayos de transcripción <i>in vitro</i>	70
8.	<b>Ensayos de ultracentrifugación analítica</b>	70
9.	<b>Recursos informáticos</b>	71
9.1.	Análisis de secuencias	71
9.2.	Construcción de árboles filogenéticos	72
9.3.	Modelado de la estructura tridimensional de proteínas	72
IV.	<b>RESULTADOS.....</b>	73
1.	<b>Identificación del <i>cluster</i> génico responsable de la ruta central para el catabolismo anaeróbico de 3-metilbenzoato en <i>Azoarcus</i> sp. CIB</b>	75
2.	<b>Confirmación de la implicación del <i>cluster mbd</i> en la degradación de 3-metilbenzoato y <i>m</i>-xileno</b>	78
2.1.	Crecimiento anaeróbico de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en 3-metilbenzoato	78
2.2.	Crecimiento anaeróbico de mutantes de <i>Azoarcus</i> sp. CIB en distintos genes del <i>cluster mbd</i> utilizando 3-metilbenzoato y <i>m</i> -xileno como fuentes de carbono	79
3.	<b>Caracterización bioquímica de actividades enzimáticas clave de la ruta <i>mbd</i></b>	81
3.1.	Análisis de la actividad 3-metilbenzoato-CoA ligasa	81
3.1.1.	Estudio y clonación del gen <i>mbdA</i>	81
3.1.2.	El gen <i>mbdA</i> codifica una 3-metilbenzoato-CoA ligasa	83
3.2.	Análisis de la actividad 3-metilbenzoyl-CoA reductasa codificada por los genes <i>mbdONQP</i>	84

3.3.	Análisis de la actividad metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa	87
3.3.1.	Clonación e hiperexpresión del gen <i>mbdW</i> y purificación de la proteína MbdW	88
3.3.2.	MbdW posee actividad metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa	90
4.	<b>Análisis transcripcional del <i>cluster mbd</i></b>	92
5.	<b>Caracterización de los promotores divergentes del <i>cluster mbd</i>: <math>P_O</math> y <math>P_{BI}</math></b>	94
5.1.	Identificación del punto de inicio de la transcripción de los genes <i>mbdO</i> y <i>mbdB1</i>	94
5.2.	Clonación y actividad de los promotores $P_O$ y $P_{BI}$ en <i>E. coli</i> y <i>Azoarcus</i> sp. CIB	96
6.	<b>Caracterización de la regulación transcripcional específica de los promotores divergentes del <i>cluster mbd</i></b>	98
6.1.	MbdR es un regulador transcripcional de los promotores $P_O$ y $P_{BI}$	99
6.2.	Caracterización del regulador MbdR	100
6.2.1.	Análisis <i>in silico</i> de la estructura de la proteína MbdR	100
6.2.2.	Clonación y purificación de la proteína MbdR	102
6.2.3.	Determinación de la estructura nativa del regulador MbdR	103
6.3.	Estudios sobre la interacción del regulador MbdR con los promotores $P_O$ y $P_{BI}$	104
6.3.1.	Análisis <i>in silico</i> de los promotores $P_O$ y $P_{BI}$	104
6.3.2.	Estudios <i>in vitro</i> de la interacción entre MbdR y los promotores $P_O$ y $P_{BI}$	105
6.4.	Identificación del inductor específico de la proteína MbdR	108
6.4.1.	Estudio <i>in vivo</i> de la inducción del promotor $P_{BI}$ por 3-metilbenzoil-CoA	108
6.4.2.	Estudio <i>in vitro</i> de la inducción de los promotores $P_O$ y $P_{BI}$ por 3-metilbenzoil-CoA	110
7.	<b>Estudio de los promotores que controlan los elementos reguladores en el <i>cluster mbd</i></b>	113
7.1.	Identificación y clonación de los promotores $P_A$ y $P_{3R}$	113
7.2.	Caracterización del promotor catabólico $P_A$	115
7.2.1.	Estudios <i>in vivo</i> del promotor $P_A$	115
7.2.2.	Estudio <i>in vitro</i> de la interacción entre MbdR y $P_A$	117
7.2.3.	Papel de los promotores $P_{BI}$ y $P_A$ en la expresión del gen <i>mbdA</i> en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	118
7.3.	Caracterización del promotor $P_{3R}$ que regula la expresión del gen <i>mbdR</i>	119
7.3.1.	Estudios <i>in vivo</i> del promotor $P_{3R}$	119
7.3.2.	Estudio <i>in vitro</i> de la interacción entre MbdR y $P_{3R}$	120
8.	<b>Estudio de la regulación sobreimpuesta en el <i>cluster mbd</i></b>	122
8.1.	Análisis de la represión catabólica sobre los promotores $P_{BI}$ y $P_{3R}$	123
8.2.	Influencia del regulador global AcpR en la expresión de los promotores $P_O$ , $P_{BI}$ y $P_{3R}$	124

ANEXO	127
-------	-----

V. DISCUSIÓN.....	139
1. Identificación y caracterización genética del <i>cluster mbd</i> , responsable de la ruta central para el catabolismo anaeróbico de 3-metilbenzoato y <i>m</i> -xileno en <i>Azoarcus</i> sp. CIB	141
2. Caracterización bioquímica del <i>cluster mbd</i>	142
2.1. Identificación y caracterización de las actividades 3MBz-CoA ligasa, 3-metilbenzoil-CoA reductasa y metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa	143
2.1.1. MbdA es la primera 3-metilbenzoato-CoA ligasa caracterizada	143

2.1.2.	Identificación de la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa, la etapa clave de la nueva ruta central mbd	146
2.1.3.	Purificación y caracterización de la metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa (MbdW)	150
2.2.	Análisis del resto de los genes catabólicos del <i>cluster mbd</i> : propuesta de la ruta mbd	154
<b>3.</b>	<b>Organización transcripcional del <i>cluster mbd</i> e identificación de su regulación específica</b>	159
3.1.	Organización transcripcional del <i>cluster mbd</i>	159
3.2.	Identificación del regulador transcripcional específico del <i>cluster mbd</i> y de su molécula inductora	161
3.3.	Modelo de la regulación transcripcional específica del <i>cluster mbd</i>	168
<b>4.</b>	<b>Regulación transcripcional sobreimpuesta del <i>cluster mbd</i></b>	171
<b>5.</b>	<b>Posible transferencia del <i>cluster mbd</i></b>	174
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	177
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	181

. . . . .

# ABREVIATURAS

<b>3D</b>	tridimensional
<b>3MBz</b>	3-metilbenzoato
<b>A</b>	adenina
<b><i>A</i><sub>600</sub></b>	densidad óptica medida a 600 nm
<b>aa</b>	aminoácido(s)
<b>ADP</b>	adenosina difosfato
<b>Ap<sup>r</sup></b>	resistencia a ampicilina
<b>ATP</b>	adenosina 5'-trifosfato
<b>b</b>	base (s)
<b>BCR</b>	benzoyl-CoA reductasa
<b>Bq</b>	Bequerelio ( $2.7 \times 10^{-11}$ Ci)
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>C</b>	citosa
<b>°C</b>	grado centígrado
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>Ci</b>	Curio ( $3.7 \times 10^{10}$ Bq)
<b>Cm<sup>r</sup></b>	resistencia a cloranfenicol
<b>CoA</b>	coenzima A
<b>CRP</b>	proteína receptora de AMPc
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	desoxiadenosina 5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	desoxicitidina 5'-trifosfato
<b>DEPC</b>	diethylpirocarbonato
<b>dGTP</b>	desoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	desoxinucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>dTTP</b>	desoxitimidina 5'-trifosfato
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetracético
<b>FAD</b>	dinucleótido de flavina y adenina
<b>FADH</b>	dinucleótido de flavina y adenina reducido
<b>G</b>	guanina
<b>Gm<sup>r</sup></b>	resistencia a gentamicina
<b>GTP</b>	guanosina 5'-trifosfato
<b>h</b>	hora
<b>His<sub>6</sub></b>	secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas
<b>HTH</b>	motivo hélice-giro-hélice
<b>IPTG</b>	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
<b>kb</b>	1000 pares de bases

<b><math>K_d</math></b>	constante de disociación aparente
<b>kDa</b>	1000 Dalton
<b>Km<sup>r</sup></b>	resistencia a kanamicina
<b>LB</b>	medio Lysogeny Broth
<b>m/v</b>	relación masa/volumen
<b>M63</b>	medio mínimo M63
<b>MA</b>	medio basal para cultivos anaerobios
<b>MC</b>	medio MA complementado
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>NAD</b>	nicotinamida-adenina-dinucleótido
<b>NADH(+H<sup>+</sup>)</b>	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
<b>NADP</b>	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
<b>NADPH(+H<sup>+</sup>)</b>	fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	nanómetro
<b>nt</b>	nucleótido(s)
<b>orf</b>	<i>open reading frame</i>
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>RBS</b>	secuencia de unión al ribosoma
<b>Rf<sup>r</sup></b>	resistencia a rifampicina
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>RNA<sub>t</sub></b>	RNA de transferencia
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
<b><math>\sigma</math></b>	factor sigma de la RNA polimerasa
<b>SDS</b>	dodecilsulfato sódico
<b>T</b>	timina
<b>TAE</b>	tampón Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	tampón Tris-Borato-EDTA
<b>TE</b>	tampón Tris-EDTA
<b>Tris</b>	tri(hidroximetil)aminometano
<b>U</b>	unidad de actividad enzimática
<b>UTP</b>	uridina trifosfato
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>v/v</b>	relación volumen-volumen
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. La biodegradación de compuestos aromáticos

---

Los compuestos aromáticos constituyen el segundo tipo de compuestos orgánicos más distribuido en la Naturaleza, sólo por detrás de los carbohidratos. Se trata de un grupo muy variado en su composición, ya que entre ellos encontramos por ejemplo flavonoides, quinonas, aminoácidos e hidrocarburos componentes de los combustibles fósiles. También son compuestos aromáticos los monómeros de la lignina (compuestos fenólicos), que es el segundo polímero más abundante en la naturaleza tras la celulosa (Adler, 1977). Las actividades humanas están relacionadas con la liberación en el medio ambiente de una importante cantidad y variedad de compuestos aromáticos (dioxinas, nitroaromáticos, bifenilos policlorados, etc.) que no existían anteriormente en la biosfera en las concentraciones en las que se encuentran en el presente (xenobióticos) (Rieger *et al.*, 2002). La categoría de compuesto aromático no se aplica sólo al benceno y sus derivados, sino que también se hace extensiva a compuestos cíclicos con dobles enlaces conjugados que poseen un número de átomos de carbono diferente de 6 en el anillo aromático (por ejemplo el furano) y a los compuestos heterocíclicos, como por ejemplo sucede con los derivados de la piridina y el tiofeno. Todos estos compuestos siguen la regla de Hückel, según la cual un compuesto aromático es una molécula cíclica, plana, conjugada y que posee  $4n+2$  ( $n$  es un número entero positivo) electrones  $\pi$  deslocalizados (Vollhardt y Schore, 1994). A pesar de la gran variedad existente de compuestos aromáticos, el metabolismo de las moléculas derivadas del benceno es el más estudiado en lo que se refiere a su degradación. La elevada estabilidad termodinámica del anillo bencénico ha permitido su uso en muchos campos de la industria (disolventes, insecticidas, polímeros artificiales, etc.) así como la explotación de muchos compuestos naturales en cuya estructura está incluido (resinas, antibióticos, etc.). Sin embargo, la cara negativa de esta estabilidad es la elevada persistencia en el medio ambiente de los compuestos en los que se encuentra, tanto naturales como xenobióticos, que en muchas ocasiones poseen una elevada toxicidad (McLeod y Eltis, 2008). Un grupo de compuestos aromáticos arquetípico en cuanto a su estabilidad y carácter recalcitrante lo constituyen los denominados BTEX, mezcla de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos. Estos cuatro compuestos se producen en elevadas cantidades y pueden ser contaminantes de acuíferos y de sedimentos, procedentes de filtraciones o vertidos de petróleo o de derivados de éste (Lin *et al.*, 2002). La toxicidad

de estos compuestos es variable, pero las consecuencias adversas que puede experimentar un organismo cuando se expone a ellos van desde daños dermatológicos leves a efectos sobre el sistema nervioso central o leucemias (Chee-Sanford *et al.*, 1996).

Dada la enorme diversidad fisiológica microbiana, que representa un papel clave en el ciclo del carbono, no resulta sorprendente que un gran número de bacterias haya evolucionado para degradar los compuestos orgánicos más frecuentes en el medio ambiente, entre los que se encuentran los persistentes compuestos aromáticos. La plasticidad de los *clusters* génicos apoyada por la promiscuidad funcional de muchas de las enzimas implicadas en la degradación de los compuestos aromáticos permite la adaptación de los microorganismos al catabolismo de los nuevos xenobióticos que se liberan en la naturaleza y guardan similitud estructural con los compuestos naturales (Díaz, 2004; McLeod y Eltis, 2008). La Biología Molecular es una herramienta fundamental que puede ser empleada para aumentar la capacidad de adaptación de las bacterias en el medio ambiente, realizando las modificaciones oportunas que les permitan degradar más eficazmente los compuestos aromáticos que se liberan en grandes cantidades a éste como consecuencia de la actividad humana. La selección de microorganismos para reducir los vertidos tóxicos (mineralización, acumulación, biotransformación), así como el diseño de biosensores permite disponer de nuevas herramientas para hacer frente a la contaminación medioambiental (Cases y de Lorenzo, 2005b; de Lorenzo, 2008).

Existen dos estrategias que los microorganismos emplean para la degradación de compuestos aromáticos, en función de la presencia o ausencia de oxígeno en el proceso. El catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos ha sido objeto de un extenso estudio (McLeod y Eltis, 2008). El metabolismo anaeróbico es primigenio respecto al aeróbico, pero sin embargo ha sido mucho menos estudiado. El estudio de las bases bioquímicas y genéticas de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos plantea la dificultad intrínseca del trabajo con microorganismos que muestran dificultades para el crecimiento en medios de cultivo habituales y para su manipulación genética (Moore, 1966).

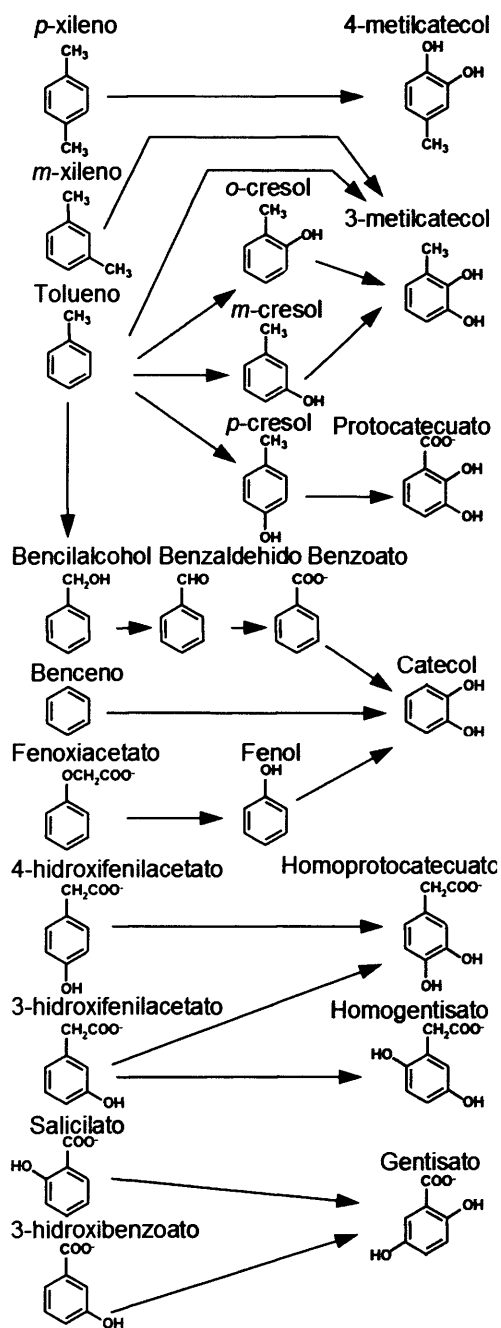
En el metabolismo de compuestos aromáticos, tanto aeróbico como anaeróbico, los compuestos se procesan a través de una gran variedad de “rutas periféricas” mediante la activación de moléculas de diferente estructura que convergen en una serie limitada de metabolitos intermediarios que a su vez se canalizan hacia el metabolismo

central a través de unas pocas “rutas centrales”, lo que también se conoce con el nombre de “embudo catabólico” (Harayama y Timmis, 1989).

## 1.1. Catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos

Una de las características del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos es que el oxígeno no se comporta sólo como un aceptor final de electrones, sino que también actúa como cosustrato en algunas etapas clave. El oxígeno es imprescindible para procesos como la hidroxilación y posterior ruptura del anillo aromático por parte de enzimas de tipo oxigenasa (Parales y Resnick, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2006).

La estrategia más frecuente para la mineralización aeróbica de los compuestos aromáticos se basa en la desestabilización de la molécula mediante rutas periféricas que incorporan grupos hidroxilo en el anillo. La adición de estos grupos provoca una desestabilización electrónica en el anillo, que ve alterado el número de sus pares de electrones libres y por tanto se vuelve más inestable a la par que reactivo. Bajo estas condiciones el compuesto aromático es sustrato de oxigenasas que catalizan la apertura del anillo mediante la adición de oxígeno. El compuesto alifático originado sufrirá una oxidación progresiva que terminará con la incorporación de los metabolitos resultantes al ciclo de Krebs.



**Figura 1. Esquema de algunas de las rutas periféricas e intermediarios centrales del catabolismo aeróbico bacteriano de compuestos aromáticos.** La figura muestra algunos de los intermediarios centrales dihidroxilados más frecuentes: el catecol y sus derivados (3-metilcatecol, 4-metilcatecol, protocatecuato y homoprotocatecuato), el gentisato y el homogentisato. Los metabolitos centrales aparecen sombreados en gris (figura modificada de Blázquez, 2009).

Las oxigenasas que incorporan los grupos hidroxilo al anillo bencénico pueden ser monooxigenasas o dioxigenasas en función de que incorporen uno o dos grupos hidroxilo, respectivamente (Gibson y Parales, 2000). Los compuestos aromáticos derivados que se forman (catecol, protocatecuato, homoprotocatecuato, gentisato, homogentisato, etc.) pueden portar uno, dos o tres grupos hidroxilo. En la Figura 1 se muestra un esquema de algunas rutas periféricas que generan los principales intermediarios catecólicos que se originan por la actividad de las oxigenasas. Las enzimas que catalizan la transformación inicial de los compuestos aromáticos en las rutas periféricas son más o menos específicas de sus sustratos y frecuentemente se inducen por ellos (Heider y Fuchs, 1997). Otra característica frecuente de la degradación de compuestos aromáticos es que un mismo compuesto puede degradarse a través de distintas rutas catabólicas como ocurre, por ejemplo, con el tolueno (Fig. 1).

Los intermediarios centrales en los que confluyen las diferentes rutas periféricas experimentan la apertura del anillo por parte de dioxigenasas específicas (Harayama y Rekik, 1989; Harayama y Timmis, 1992; van der Meer *et al.*, 1992; Harwood y Parales, 1996). El tipo de dioxigenasa que actúa varía en función de la posición del enlace de ruptura del anillo respecto a los grupos hidroxilo. Las intradiol dioxigenasas (dependientes de  $\text{Fe}^{3+}$ ) catalizan la denominada “ruptura *orto*” entre dos grupos hidroxilo. En cambio, las extradiol dioxigenasas (dependientes de  $\text{Fe}^{2+}$ ) catalizan la “ruptura *meta*” adyacente a uno de los grupos hidroxilo. Otras dioxigenasas de ruptura son capaces de catalizar la apertura de compuestos monohidroxilados, como el 2-aminofenol (Takenaka *et al.*, 1997) y el 1-hidroxi-2-naftoato (Iwabuchi y Harayama, 1998). También existen dioxigenasas que actúan sobre compuestos trihidroxilados como el hidroxiquinol (Armengaud *et al.*, 1999) y el ácido gálico (Nogales *et al.*, 2005).

## 1.2. Catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos

A pesar de que el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos está mucho menos estudiado que el catabolismo aeróbico, un gran número de hábitats de gran importancia ecológica en los que no está presente el oxígeno presentan contaminación por compuestos aromáticos. Acuíferos subterráneos, sedimentos acuáticos, lechos sumergidos y hábitats acuáticos estáticos en los que existen abundantes fuentes de carbono representan buenos ejemplos de regiones de la biosfera en las que están presentes compuestos aromáticos y en las que no abunda el oxígeno (Lovley, 2003). En

muchos de estos entornos naturales contaminados, los microorganismos degradadores de compuestos aromáticos constituyen un pilar fundamental de los ciclos biogeoquímicos (Evans y Fuchs, 1988; Lovley, 2001; Widdel y Rabus, 2001; Gibson y Harwood, 2002; Lovley, 2003; Heider, 2007). La baja reactividad química de los compuestos aromáticos requiere la acción de una maquinaria bioquímica especializada que, además de resultar de un gran interés a nivel de ciencia básica y estudios evolutivos, posee un gran interés industrial por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. De hecho, algunas reacciones que hasta hace unos pocos años sólo se conocían en el campo de la química orgánica, ahora se sabe que también se desarrollan en procesos bioquímicos de microorganismos anaeróbicos, como la reducción anaeróbica del benzoato (conocida como reducción de Birch) y la carboxilación anaeróbica del fenol (carboxilación de Kobe-Schmitt) (Fuchs, 2008).

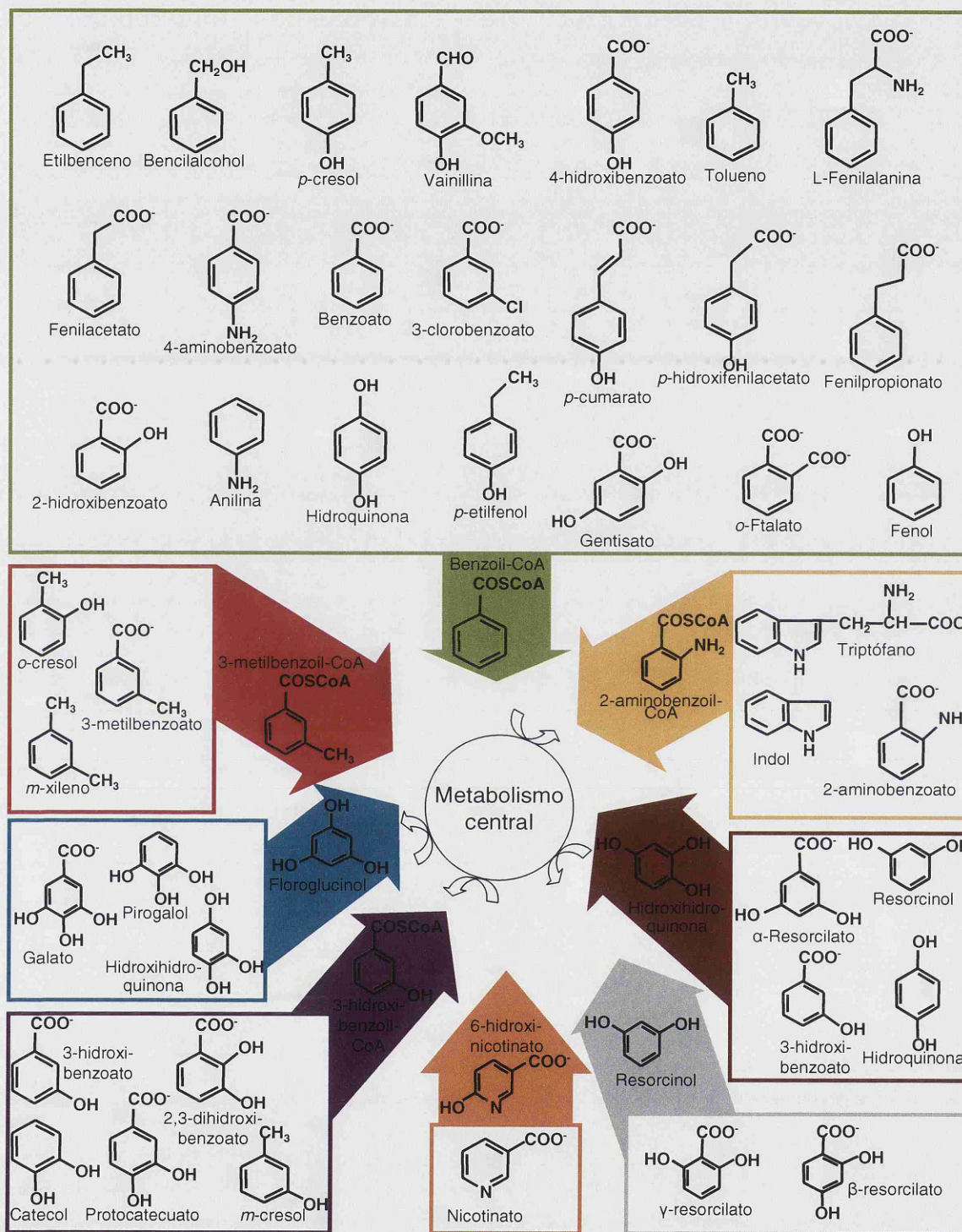
A pesar de que se han estudiado en profundidad algunos de los procesos bioquímicos propios de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, los determinantes genéticos y los mecanismos reguladores relacionados con ellos no se han estudiado con la misma profundidad. Las técnicas de secuenciación de genomas han permitido obtener en los últimos tiempos una información más completa del potencial catabólico de diferentes proteobacterias que degradan anaeróbicamente compuestos aromáticos como por ejemplo *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ( $\alpha$ -proteobacteria fotótrofa; Larimer *et al.*, 2004), *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 ( $\alpha$ -proteobacteria desnitrificante; Matsunaga *et al.*, 2005), *Aromatoleum aromaticum* EbN1 ( $\beta$ -proteobacteria desnitrificante; Rabus *et al.*, 2005), *Thauera* sp. MZ1T ( $\beta$ -proteobacteria desnitrificante; CP001281), *Geobacter metallireducens* GS-15 ( $\delta$ -proteobacteria reductora de hierro; Butler *et al.*, 2007), *Syntrophus aciditrophicus* SB ( $\delta$ -proteobacteria fermentadora; McInerney *et al.*, 2007). Las bacterias que degradan anaeróbicamente compuestos aromáticos pueden utilizar diferentes aceptores finales de electrones, que pueden ser moléculas como  $\text{NO}_3^-$  (que se reduce a  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{N}_2$ ; Spormann y Widdel, 2000),  $\text{Fe}^{3+}$  (reducido a  $\text{Fe}^{2+}$ ; Coates *et al.*, 2001),  $\text{SO}_4^{2-}$  (reducido a  $\text{SO}_3^{2-}$  o  $\text{SO}_2$ ; Morasch *et al.*, 2004b; Peters *et al.*, 2004), o de forma menos frecuente  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{ClO}^+$ ,  $\text{Cr}^{4+}$ ,  $\text{V}^{4+}$ , óxido de trimetilamina, dimetil sulfóxido (DMSO), fumarato, etc. (Coates *et al.*, 2002; Gibson y Harwood, 2002; Lovley, 2003; Chakraborty y Coates, 2004). En los procesos fermentativos la fuente de carbono se degrada anaeróbicamente a través de una serie de reacciones en las que los aceptores de electrones son compuestos orgánicos y el ATP se forma mediante fosforilación a nivel de sustrato. El rendimiento energético de este proceso en muchas ocasiones no permite

una mineralización total de los compuestos aromáticos, que se transforman en metabolitos cuya degradación completarán microorganismos sintróficos (Evans y Fuchs, 1988; Elshahed *et al.*, 2001).

La identificación de las cepas bacterianas presentes en los ambientes anóxicos revela la presencia frecuente de microorganismos encuadrados en el género *Azoarcus*. Los primeros miembros de este taxón se aislaron por primera vez en la rizosfera de *Leptochloa fusca* (L.) Kunth (hierba de Kallar) y mediante los primeros análisis fisiológicos se definieron como microorganismos no desnitrificantes (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993) con actividad nitrogenasa (Fries *et al.*, 1994). Los estudios posteriores aumentaron el número de especies identificadas dentro del género *Azoarcus* y demostraron que muchas de estas mostraban metabolismo desnitrificante en presencia de diversos compuestos aromáticos suministrados como única fuente de carbono y energía. Algunas de las nuevas especies identificadas presentaban un metabolismo anaerobio estricto, *Azoarcus anaerobius* (Springer *et al.*, 1998), mientras que otras eran anaerobias facultativas, como *Azoarcus evansii* (Anders *et al.*, 1995), *Azoarcus tolulyticus* (Zhou *et al.*, 1995), *Azoarcus toluvorans* (Fries *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1999), *Azoarcus toluclasticus* (Song *et al.*, 1999) y *Azoarcus buckelii* (Mechichi *et al.*, 2002). La bacteria *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (Rabus y Widdel, 1995) en un principio se identificó como un miembro del género *Azoarcus*, pero en la actualidad se clasifica como un miembro del nuevo género *Aromatoleum*. Todos los miembros del género *Azoarcus* poseen motilidad, debida en la mayoría de los casos a un único flagelo polar (Anders *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1999), y casi todos ellos presentan morfología de diplobacilo, si bien algunas cepas cultivadas en *m*-xileno en condiciones desnitrificantes (Hess *et al.*, 1997) presentan morfología de coco. El trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo con la cepa *Azoarcus* sp. CIB, que posee la capacidad de degradar anaeróbicamente diversos compuestos aromáticos como por ejemplo *m*-xileno, tolueno, benzoato, fenilacetato y 3-hidroxibenzoato (López-Barragán *et al.*, 2004a).

En los siguientes apartados se analizarán de forma breve los principales *clusters* génicos que codifican las rutas periféricas y centrales de la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos.





**Figura 2. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de los compuestos monoaromáticos.** Un amplio rango de compuestos aromáticos (enmarcados en diferentes recuadros coloreados en la figura) se degrada a través de diferentes rutas periféricas dando lugar a un número limitado de intermediarios centrales (flechas rellenas), tales como benzoil-CoA, 2-aminobenzoil-CoA, 3-hidroxibenzoil-CoA, 3-metilbenzoil-CoA, 6-hidroxinicotinato, resorcinol, floroglucinol e hidroxihidroquinona. Todos estos compuestos son desaromatizados y canalizados al metabolismo central de la célula a través de las denominadas rutas centrales. Como se puede apreciar, algunos de los compuestos aromáticos pueden ser degradados a través de diferentes rutas periféricas y centrales. El tipo de metabolismo respiratorio de la bacteria anaeróbica es en muchos casos determinante para la presencia de uno u otro tipo de ruta.

### **1.2.1. Rutas periféricas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos**

Como se ha indicado anteriormente, las rutas periféricas son las encargadas de transformar o eliminar grupos funcionales de los compuestos aromáticos para convertirlos en uno de los intermediarios centrales del catabolismo de este tipo de moléculas. Como se muestra en la Figura 2, los principales intermediarios centrales del catabolismo anaeróbico de los compuestos monoaromáticos homocíclicos son: benzoil-CoA (y sus derivados 2-amino, 3-hidroxi y 3-metil), floroglucinol, hidroxihidroquinona y resorcinol (Heider y Fuchs, 1997; Harwood *et al.*, 1999; Gibson y Harwood, 2002; Fuchs, 2008; Carmona *et al.*, 2009). En algunos casos las rutas periféricas consisten en un único paso de activación, como ocurre por ejemplo con el benzoato, el 3-hidroxibenzoato y el 2-aminobenzoato, que se activan a sus correspondientes aril-CoA ésteres. En otros casos las rutas periféricas consisten en múltiples reacciones encadenadas conducentes a transformar el compuesto aromático en el metabolito intermediario. Cualquier compuesto que vaya ser degradado a través de la ruta del benzoil-CoA debe poseer en su estructura un grupo carboxilo o un grupo alquilo capaz de ser oxidado para dar lugar al correspondiente carboxilo. En los casos en los que esto no es así, el compuesto sufre una carboxilación para dar lugar al ácido aromático derivado, que será activado como un tioéster de CoA (Gibson y Harwood, 2002; Schühle y Fuchs, 2004).

#### **1.2.1.1. Activación de ácidos orgánicos aromáticos con tioésteres de CoA: rutas anaeróbicas y rutas híbridas**

Varios de los metabolitos intermediarios presentados en la Figura 2 son compuestos activados con un grupo CoA, que representa un elemento de desestabilización del anillo aromático similar al ejercido por los grupos hidroxilo en la degradación aeróbica de compuestos aromáticos (Heider y Fuchs, 1997). Los modelos bioquímicos propuestos sugieren que la tioesterificación con CoA no sólo supondría una disminución del potencial redox de la molécula sustrato, sino que podría jugar un importante papel en el transporte y acumulación de los ácidos aromáticos en el interior de la bacteria (Harwood y Gibson, 1986), así como facilitar su reconocimiento por las enzimas implicadas en su degradación (Heider y Fuchs, 1997).

La tioesterificación de ácidos orgánicos con CoA es un paso clave en la degradación anaeróbica de multitud de compuestos aromáticos, pero no se trata de un paso exclusivo de este tipo de rutas. Se han descrito rutas aeróbicas para el catabolismo de compuestos aromáticos en las que el sustrato para las reacciones de oxigenación es un tioéster de CoA del compuesto aromático (Gescher *et al.*, 2005). Estas rutas se denominan “rutas aeróbicas híbridas” y se han identificado en la degradación de los ácidos fenilacético, benzoico y aminobenzoico, entre otros, en numerosos microorganismos (Altenschmidt y Fuchs, 1992; Ferrández *et al.*, 1998; Bains y Boulanger, 2007).

En algunos casos, como en el de la degradación del benzoato, se cree podrían representar una ventaja adaptativa para los microorganismos anaerobios facultativos que habitan en medios en los que se producen oscilaciones frecuentes en la concentración de oxígeno, puesto que el tioéster de CoA del compuesto aromático puede ser sustrato tanto de rutas aeróbicas como anaeróbicas (Niemetz *et al.*, 1995; Fuchs, 2008)

### 1.2.1.2. Actividades CoA ligasa

Las enzimas encargadas de la tioesterificación con CoA de los ácidos aromáticos se conocen como CoA ligasas. De forma genérica podemos decir que se trata de enzimas formadas por un único tipo de subunidad cuyo tamaño oscila entre los 48 y los 65 kDa (Heider y Fuchs, 1997). Para llevar a cabo su catálisis requieren un cofactor, el  $Mg^{2+}$ , así como dos sustratos, CoA y ATP. El CoA se incorpora al compuesto aromático y el ATP se hidroliza a AMP + 2Pi.

Algunos ejemplos representativos de enzimas CoA-ligasas que han sido caracterizadas y cuyos genes han sido clonados y secuenciados son los siguientes:

- Benzoato-CoA ligasas: *R. palustris* (Egland *et al.*, 1995), *T. aromatica* (Schühle *et al.*, 2003), *Azoarcus* sp. CIB (López-Barragán *et al.*, 2004a), *Burkholderia xenovorans* LB400 (Bains y Boulanger, 2007).
- 4-hidroxibenzoato-CoA ligasas: *R. palustris* (Biegert *et al.*, 1993), *T. aromatica* (Gibson *et al.*, 1994).
- Fenilacetato-CoA ligasas: *A. evansii* (Mohamed y Fuchs, 1993), *Pseudomonas putida* U (Miñambres *et al.*, 1996), *Escherichia coli* (Ferrández *et al.*, 1998).

En algunos microorganismos, como por ejemplo *T. aromatica*, además de las CoA ligasas citadas anteriormente se han caracterizado otras CoA ligasas, tales como la 3-hidroxibenzoato-CoA ligasa implicada en el catabolismo anaeróbico de 3-hidroxibenzoato (Laempe *et al.*, 2001) y la 2-aminobenzoato-CoA ligasa implicada en el catabolismo aeróbico y anaeróbico de 2-aminobenzoato (Schühle *et al.*, 2003). En *A. evansii* se han caracterizado dos benzoato-CoA ligasas (Mohamed *et al.*, 2001) y dos 2-aminobenzoato-CoA ligasas (Schühle *et al.*, 2001) cada una de estas isoenzimas implicada en la degradación aeróbica o anaeróbica de benzoato y 2-aminobenzoato, respectivamente. Por otro lado, en *R. palustris* también se ha purificado y caracterizado una 3-clorobenzoato-CoA ligasa (Samanta y Harwood, 2005), implicada en la degradación de dicho derivado halogenado. Por lo tanto, existen diferentes CoA ligasas codificadas en los genomas de los microorganismos.

En la Tabla 1 se presenta una selección de enzimas CoA-ligasas que actúan sobre el benzoato y algunos de sus derivados. Como se puede observar estas enzimas presentan unas características similares en cuanto su masa molecular y pI. La benzoato-CoA ligasa BCL<sub>M</sub> de *B. xenovorans* LB400 (Bains y Boulanger, 2007) es la primera CoA ligasa que ha sido cristalizada y cuya estructura tridimensional ha sido desentrañada (PDB 2V7B). La estructura de la proteína ha permitido ubicar los aminoácidos necesarios para la actividad catalítica y proponer un modelo de interacción de las benzoato-CoA ligasas con sus sustratos (Bains y Boulanger, 2007).

Sustrato preferente	Microorganismo	Nombre proteína	T (aa)	Mm (kDa)	pI	Ref. GenBank	Publicación
Benzoato	<i>R. palustris</i> CG.A009	BadA	523	57	6.5	CAF26105	Figland <i>et al.</i> , 1995
Benzoato	<i>A. evansii</i>	BclA	529	58	5.6	AAN39371	Gescher <i>et al.</i> , 2002
Benzoato	<i>T. aromatica</i>	BclA	527	57	5.3	CAD21683	Schühle <i>et al.</i> , 2003
Benzoato	<i>Azoarcus</i> sp. CIB	BzdA	533	57	5.7	AAQ08820	López-Barragán <i>et al.</i> , 2004a
Benzoato	<i>D. multivorans</i>	BclA	516	58	5.6	ACP50613	Peters <i>et al.</i> , 2004
Benzoato	<i>G. metallireducens</i>	BamY	523	59	5.7	ABB32372	Wischgoll <i>et al.</i> , 2005
Benzoato	<i>Magnetospirillum</i> sp. TS-6	BclA	528	58	6.0	BAE91925	Kawaguchi <i>et al.</i> , 2006
Benzoato	<i>B. xenovorans</i> LB400	BCL <sub>C</sub>	531	57	5.8	ABF36771	Bains y Boulanger, 2007
Benzoato	<i>B. xenovorans</i> LB400	BCL <sub>M</sub>	530	57	5.6	ABF31536	Bains y Boulanger, 2007
3-hidroxibenzoato	<i>T. aromatica</i>	Hbcl	523	58	5.4	CAC28158	Laempe <i>et al.</i> , 2001
4-hidroxibenzoato	<i>R. palustris</i>	HbaA	539	59	5.5	CAE26113	Gibson <i>et al.</i> , 1994
2-aminobenzoato	<i>A. evansii</i>	AbmG	542	59	6.0	AAI.02069	Schühle <i>et al.</i> , 2001
3-clorobenzoato	<i>R. palustris</i> RCB100	AlcA <sub>100</sub>	547	60	5.8	-	Samanta y Harwood, 2005

**Tabla 1. Características principales de una selección de actividades CoA ligasas que actúan sobre el benzoato y sus derivados.** En la tabla se muestran diferentes actividades CoA ligasas que han sido identificadas en rutas catabólicas de compuestos aromáticos, junto a su sustrato preferente y a los microorganismos en los que se identificaron, así como algunos parámetros básicos de las proteínas responsables de estas actividades: tamaño, T (en aa); masa molecular, Mm (en kDa); punto isoeléctrico (pI).

Las actividades CoA ligasa poseen una gran interés biotecnológico, ya que los tioésteres de CoA constituyen un grupo de intermediarios activados que poseen papeles clave en diferentes rutas bioquímicas. El benzoil-CoA, por ejemplo, es sustrato en las plantas de diferentes actividades enzimáticas relacionadas con la transferencia de grupos benzoilo en rutas biosintéticas de compuestos tales como la cocaína y el taxol (Beuerle y Pichersky, 2002).

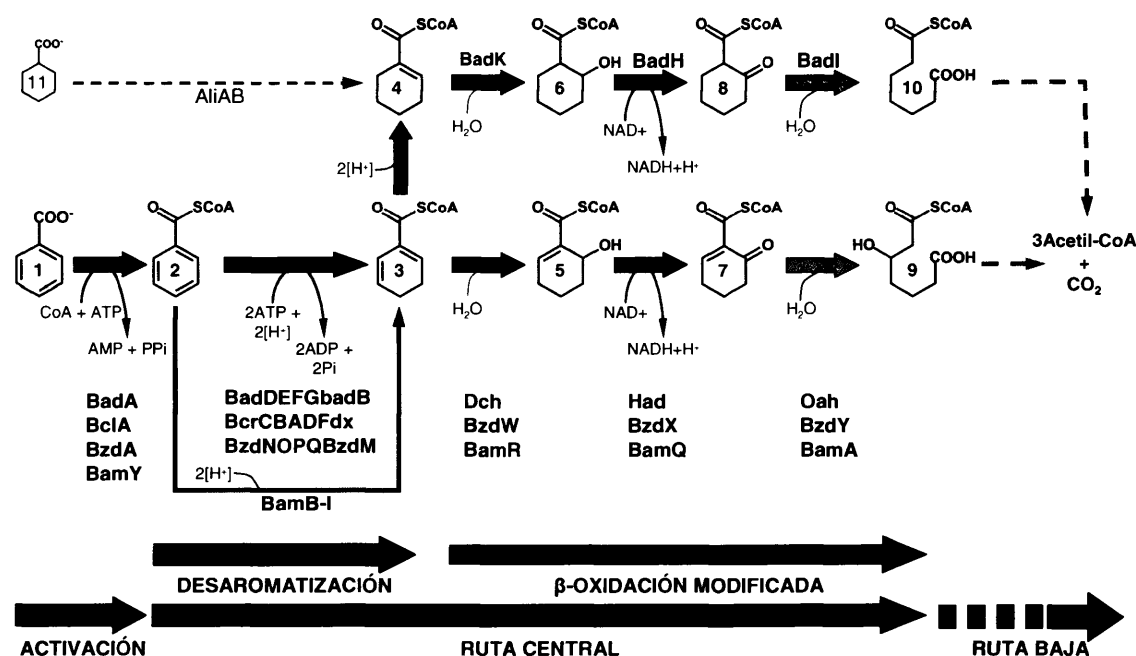
### **1.2.2. Rutas centrales del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos**

Las diversas rutas periféricas canalizan la degradación de los compuestos aromáticos hacia un número reducido de metabolitos (Fig. 2). Estos metabolitos continúan su incorporación al metabolismo bacteriano central a través de las denominadas rutas centrales, encargadas de la desaromatización y apertura del anillo. La ruta central mejor caracterizada es la de la degradación del benzoil-CoA (Breese *et al.*, 1998; Egland *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 1999; López-Barragán *et al.*, 2004a; Shinoda *et al.*, 2005; Wischgoll *et al.*, 2005; McInerney *et al.*, 2007). Las rutas de degradación del 3-hidroxibenzoil-CoA, 2-aminobenzoil-CoA, resorcinol, floroglucinol, hidroxihidroquinona y 6-hidronicotinato han sido mucho menos estudiadas (Lochmeyer *et al.*, 1992; Heider *et al.*, 1998; Philipp y Schink, 1998; Schink *et al.*, 2000; Laempe *et al.*, 2001; Boll, 2005a; Wöhlbrand *et al.*, 2007; Darley *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.1. Bioquímica de la ruta central del benzoil-CoA**

El benzoato posee ciertas ventajas respecto a otros compuestos aromáticos a nivel de manejo en el laboratorio, como por ejemplo una mayor solubilidad y menor toxicidad. Por ello, el benzoato se ha utilizado como el compuesto modelo para el análisis de la degradación anaeróbica de compuestos monoaromáticos, y la ruta central del benzoil-CoA ha sido la más estudiada. El catabolismo anaeróbico del benzoato se ha estudiado a nivel bioquímico en gran número de microorganismos anaerobios tales como *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998), *Azoarcus* spp. (Harwood *et al.*, 1999; López-Barragán *et al.*, 2004a; Fuchs, 2008), *Magnetospirillum* spp. (López-Barragán *et al.*, 2004b; Shinoda *et al.*, 2005), *R. palustris* CGA009 (Egland *et al.*, 1997), *Desulfococcus multivorans* (Peters *et al.*, 2004), *G. metallireducens* GS-15 (Wischgoll *et al.*, 2005) y *S. aciditrophicus* (McInerney *et al.*, 2007). La degradación de benzoato en todos estos casos tiene lugar a través de una ruta periférica consistente en un único paso catalizado por una benzoato-

CoA ligasa que activa el benzoato a benzoil-CoA. El benzoil-CoA es posteriormente degradado hasta acetil-CoA y CO<sub>2</sub> mediante una serie de reacciones enzimáticas que constituyen la ruta central del benzoil-CoA. La ruta central del benzoil-CoA se organiza en dos tramos catabólicos: a) ruta central propiamente dicha o ruta alta, que convierte el benzoil-CoA en un compuesto alifático C7-dicarboxil-CoA; b) ruta baja, que transforma el producto de la ruta alta en acetil-CoA y CO<sub>2</sub> mediante reacciones similares a las de la β-oxidación de ácidos dicarboxílicos (Carmona *et al.*, 2009) (Fig. 3).



**Figura 3. Reacciones enzimáticas de la ruta del catabolismo anaeróbico del benzoato en diversas bacterias.** En la parte inferior de la figura se indican las diferentes fases de la degradación: (I) Ruta periférica o activación del benzoato a benzoil-CoA por medio de la benzoato-CoA ligasa (flecha roja); (II) Ruta central, o alta, del benzoil-CoA (flecha naranja) donde tiene lugar la reducción del anillo aromático por medio de la benzoil-CoA reductasa (flechas azul oscuro) y la β-oxidación modificada (flecha verde oliva) mediante hidratación (flechas verde claro), deshidrogenación (flechas azul claro) e hidrólisis (flechas amarillas) del compuesto alicíclico; (III) Ruta baja del benzoil-CoA (flechas grises) que genera 3 moléculas de acetil-CoA y una de CO<sub>2</sub>. También se muestra la ruta convergente del ciclohexanocarboxilato, que es activado por una CoA ligasa (AliA) y seguidamente deshidrogenada por una ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (AliB) (flecha morada). Se indican también las enzimas implicadas en cada una de las etapas señaladas en *R. palustris* (Bad), *Thauera* / *Magnetospirillum* (Bcr), *Azoarcus* (Bzd), *Geobacter* / *Syntrophus* / *Desulfotobacterium* (Bam). Los metabolitos representados en la figura se indican a continuación: (1) benzoato; (2) benzoil-CoA; (3) ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA; (4) ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (5) 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (6) 2-hidroxiciclohexano-1-carbonil-CoA; (7) 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; (8) 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA; (9) 3-hidroxipimelil-CoA; (10) pimelil-CoA; (11) ciclohexanocarboxilato. La serie de metabolitos (4, 6, 8, 10) sólo se ha descrito en *R. palustris*, microorganismo en el que la benzoil-CoA reductasa BadDEFG realiza una reducción extra del anillo aromático, mientras que la serie (3, 5, 7, 9) está presente en bacterias de los géneros *Thauera*, *Azoarcus*, *Magnetospirillum*, *Geobacter* y *Syntrophus*.

La ruta central del benzoil-CoA se puede subdividir a su vez en dos etapas:

- **Reducción del anillo aromático del benzoil-CoA:** Consiste en la eliminación del carácter aromático del anillo de carbono, por lo que se trata del paso clave en el proceso de degradación anaeróbica del benzoil-CoA. La actividad enzimática encargada de la catálisis es la benzoil-CoA reductasa (BCR), que constituye el único paso de la ruta sensible a oxígeno (Boll y Fuchs, 1995). La maquinaria enzimática necesaria para la reducción del anillo aromático es compleja y requiere una gran cantidad de energía. El proceso de reducción del benzoil-CoA sigue un mecanismo análogo a la reacción de Birch, de tal forma que se produce una transferencia de electrones y protones en unas condiciones en las que los potenciales redox son muy bajos (Boll *et al.*, 2002; Boll, 2005a y b). El grupo tioéster del benzoil-CoA facilita la reducción, razón que explica la activación de ácidos orgánicos aromáticos con CoA (Fuchs, 2008). Las benzoil-CoA reductasas descritas en la literatura se clasifican en dos grandes grupos en función de su dependencia de ATP:

a) Benzoil-CoA reductasas independientes de ATP: pertenecen a organismos anaerobios estrictos como *G. metallireducens* y *S. aciditrophicus* (Kung *et al.*, 2009; Löffler *et al.*, 2011). Son complejos multiproteicos BamBCDEFGHI cuyo núcleo catalítico está constituido por las proteínas BamBC organizadas como un heterotetrámero  $\alpha_2\beta_2$ .

b) Benzoil-CoA reductasas dependientes de ATP: pertenecen a bacterias anaerobias facultativas tales como *T. aromatica* (Boll y Fuchs, 1995), *R. palustris* (Gibson y Gibson, 1992), *Azoarcus* spp. (Ebenau-Jehle *et al.*, 2003; López-Barragán *et al.*, 2004a).

Por otro lado, las benzoil-CoA reductasas se pueden clasificar en función de las dos variantes de la reducción que se han descrito, y que se diferencian en el producto final (Fig. 3):

a) Tipo *Thauera*: en *T. aromatica*, *Azoarcus* spp, *Magnetospirillum* spp., *Desulfococcus multivorans*, *G. metallireducens* y *S. aciditrophicus* el benzoil-CoA se reduce a ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA (dienoil-CoA).

b) Tipo *Rhodospseudomonas*: en *R. palustris* se produce una reducción extra que implica dos electrones adicionales y que da lugar a ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (enoil-CoA) (Egland *et al.*, 1997; Boll, 2005a y b; Carmona y Díaz, 2005).



La única benzoil-CoA reductasa purificada hasta la fecha en un microorganismo desnitrificante es la de *T. aromatica* (Boll y Fuchs, 1995), un heterotetrámero  $\alpha\beta\gamma\delta$  (BcrABCD). Las subunidades  $\alpha$  y  $\delta$  constituyen un módulo de activación que posee dos sitios de unión para ATP y un *cluster*  $[4\text{Fe-4S}]^{+1/+2}$  que permite la entrada de electrones al sistema. Por otro lado, las subunidades  $\beta\gamma$  definen el módulo catalítico que coordina dos sitios  $[4\text{Fe-4S}]^{+1/+2}$  más y une una molécula de benzoil-CoA (Möbitz y Boll, 2002; Boll, 2005a y b).

La reducción del benzoil-CoA en microorganismos anaerobios facultativos es un proceso gravoso a nivel energético que requiere el consumo de dos moléculas de ATP por cada anillo que se reduce (Boll, 2005a y b). Además, se requiere la donación de poder reductor por parte de una ferredoxina, cuya capacidad reductora ha de ser regenerada por una maquinaria enzimática específica. En *T. aromatica* se ha descrito una actividad  $\alpha$ -cetoglutarato:ferredoxina óxido-reductasa, compuesta por dos subunidades y codificada por los genes *korAB* (Dörner y Boll, 2002). Sin embargo, en las especies del género *Azobars* las actividades  $\alpha$ -cetoglutarato:ferredoxina óxido-reductasa que han sido identificadas son dependientes de  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  y se relacionan con sistemas de tres componentes, como los codificados por los genes *korABC* (Ebenau-Jehle *et al.*, 2003; Rabus *et al.*, 2005). La actividad conjunta de la ferredoxina y la actividad óxido-reductasa es indispensable para el funcionamiento de la reductasa.

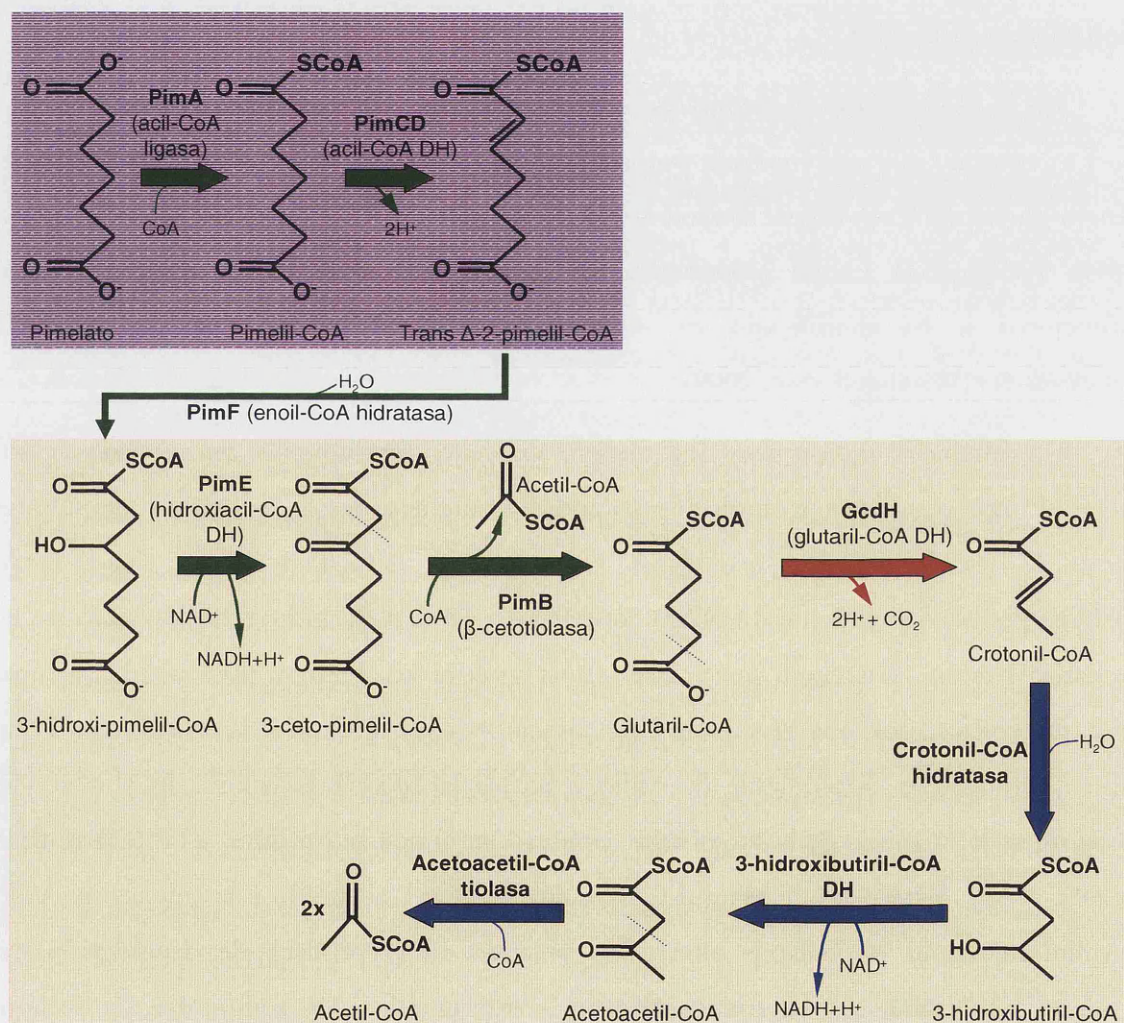
La reducción del benzoil-CoA en los microorganismos anaerobios estrictos parece implicar la participación de un sistema de transporte de electrones diferente del caracterizado para anaerobios facultativos. En *G. metallireducens* se ha detectado mediante experimentos proteómicos una elevada expresión de proteínas de membrana relacionadas con la producción de energía (Heintz *et al.*, 2009), que podrían jugar un papel relevante en una transferencia de electrones dependiente del potencial de membrana a BamDEFGHI, que a su vez donarían los electrones al núcleo catalítico BamBC (Kung *et al.*, 2009).

- **$\beta$ -oxidación modificada:** El producto alicíclico resultante de la actividad BCR experimenta una serie de reacciones en cadena que se asemejan a una  $\beta$ -oxidación. El compuesto alicíclico sufre la incorporación sucesiva de una molécula de agua por la acción de una acil-CoA hidratasa, una deshidrogenación catalizada por una hidroxiacl-CoA deshidrogenasa y, finalmente, la hidrólisis por una oxoacil-CoA hidrolasa, que genera un compuesto alifático dicarboxil-CoA de



siete carbonos. Dependiendo de la naturaleza del producto de la reducción del benzoil-CoA, se han definido dos vías alternativas:

- $\beta$ -oxidación tipo *Thauera*: descrita por primera vez en esta bacteria, emplea como sustrato el dienil-CoA cíclico producto de la BCR y genera 3-hidroxi-pimelil-CoA (Laempe *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 1999).
- $\beta$ -oxidación tipo *Rhodopseudomonas*: descrita en *R. palustris*, cataliza la transformación del enil-CoA cíclico producto de la BCR y da lugar a pimelil-CoA (Pelletier y Harwood, 1998; Harwood *et al.*, 1999; Pelletier y Harwood, 2000).



**Figura 4. Ruta baja del benzoil-CoA.** A través de la ruta central, el benzoil-CoA se transforma en pimelil-CoA (*R. palustris*, rectángulo morado) o 3-hidroxi-pimelil-CoA (en otras bacterias, rectángulo amarillo), dos intermediarios de la ruta de degradación del ácido graso dicarboxílico pimelato. El compuesto C7-dicarboxil-CoA se degrada a través de la serie de reacciones que se muestran hasta dar lugar a tres moléculas de acetil-CoA y una de  $CO_2$ . La ruta baja consiste en una  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos dicarboxílicos de cadena larga (flechas verdes), una glutaril-CoA deshidrogenasa (flecha roja) y una  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena corta (flechas azules). Las actividades de tipo deshidrogenasa se abrevian en la figura como DH.

El análisis comparativo de las enzimas implicadas en las dos variantes de la ruta muestra diferencias significativas, tanto en las especificidades de sustrato de cada una de ellas como en su estructura primaria (Carmona *et al.*, 2009).

La ruta baja del benzoil-CoA prosigue con la degradación de los derivados alifáticos dicarboxil-CoA hasta generar tres moléculas de acetil-CoA y una de CO<sub>2</sub> (Gallus y Schink, 1994; Harrison y Harwood, 2005) (Fig. 4). La degradación del pimelil-CoA continúa con un proceso  $\beta$ -oxidativo que da lugar a 3-hidroxipimelil-CoA, por lo que tanto en la ruta tipo *Rhodopseudomonas* como en la tipo *Thauera* se forma finalmente 3-hidroxipimelil-CoA (Harrison y Harwood, 2005). Este compuesto sufre una nueva  $\beta$ -oxidación en la que se acaba produciendo glutaril-CoA con la liberación de una molécula de acetil-CoA.

En la mayoría de microorganismos la oxidación y descarboxilación del glutaril-CoA a crotonil-CoA está mediada por una glutaril-CoA deshidrogenasa bifuncional que genera glutaconil-CoA como intermediario de la reacción (Gomes *et al.*, 1981; Fu *et al.*, 2004). La proteína GcdH responsable de la actividad glutaril-CoA deshidrogenasa bifuncional se ha identificado en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008) y *G. metallireducens* (Wischgoll *et al.*, 2009).

En algunos organismos que tienen un bajo rendimiento energético en su metabolismo, como por ejemplo las bacterias fermentadoras o reductoras de sulfato como *D. multivorans*, el glutaril-CoA sufre una oxidación por una glutaril-CoA deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que lleva a cabo la deshidrogenación pero no la descarboxilación (Wischgoll *et al.*, 2009; Wischgoll *et al.*, 2010) y posteriormente una descarboxilación por una glutaconil-CoA descarboxilasa anclada a la membrana. Esta última actividad es dependiente de sodio y acopla la descarboxilación con el paso de iones de sodio a través de la membrana, proceso en el que se produce ATP (Dimroth y Schink, 1998). Este paso de glutaril-CoA a crotonil-CoA acoplado a la síntesis de ATP permite mantener un balance energético positivo en el proceso de degradación de compuestos aromáticos en microorganismos fermentadores y reductores de sulfato (Elshahed y McInerney, 2001; Wischgoll *et al.*, 2009).

Las actividades enzimáticas encargadas de la reacción de conversión del crotonil-CoA en acetil-CoA, como por ejemplo la de la crotonil-CoA hidratasa (3-hidroxibutiril-CoA deshidratasa), 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa y acetoacetil-CoA tiolasa, se han descrito en diversas bacterias, y se trata de actividades pertenecientes a la ruta

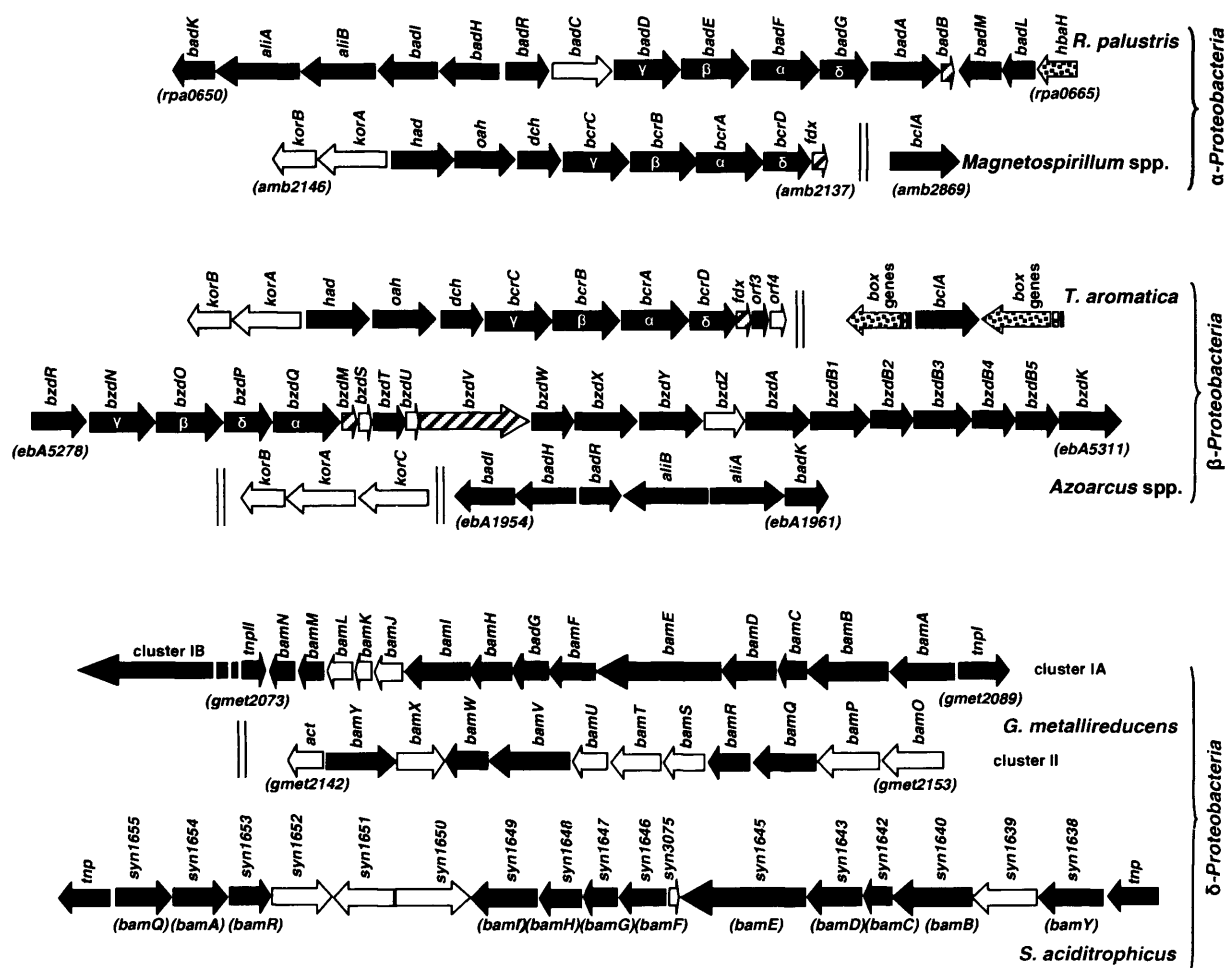
general de degradación de ácidos grasos de cadena corta (Gallus y Schink, 1994; Auburger y Winter, 1996; Elshahed *et al.*, 2001; Elshahed y McInerney, 2001). Los supuestos genes codificantes de dichas enzimas se han identificado en el genoma de varios microorganismos biodegradadores anaeróbicos (Harrison y Harwood, 2005; Rabus, 2005).

#### 1.2.2.2. Genética de la ruta central del benzoil-CoA

Los estudios sobre los *clusters* codificantes de la ruta central del benzoil-CoA se iniciaron en *T. aromatica* y *R. palustris* (Egland *et al.*, 1997; Breese *et al.*, 1998). En la Figura 5 se muestra la organización de los *clusters* génicos relacionados con la degradación anaeróbica del benzoato en diferentes microorganismos (Carmona *et al.*, 2009).

En *R. palustris* se encuentran asociados en una única agrupación génica de 25.4 kb los genes necesarios para el catabolismo anaeróbico de varios compuestos aromáticos: genes *bad* (*benzoic acid degradation*, degradación de benzoato), genes *ali* (degradación de ácidos alicíclicos como el ciclohexanocarboxilato) y genes *hba* (ruta periférica de degradación del 4-hidroxibenzoato). Los genes *badDEFG* se inducen específicamente por benzoato y codifican las cuatro subunidades de la benzoil-CoA reductasa (Egland *et al.*, 1997), mientras que *badB* aparentemente codifica la ferredoxina implicada en la donación de electrones necesaria para la reducción del anillo aromático. El gen *badA* codifica la benzoato-CoA ligasa necesaria para la activación del benzoato y pertenece a la misma unidad transcripcional que *badB* (Fig. 5). Los genes *badK* y *badH* codifican una enoil-CoA hidratasa y una deshidrogenasa, respectivamente, que están relacionadas con la  $\beta$ -oxidación modificada del ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA a 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA (Fig. 3). La apertura del anillo alicíclico la realizaría el producto proteico de *badI* mediante una actividad 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA hidrolasa. Los genes *badH*, *badK*, *badI*, junto a los genes *aliA* y *aliB* implicados en el catabolismo del ciclohexanocarboxilato, se organizan en una unidad transcripcional, divergente a la del resto de los genes *bad*.

Los estudios realizados hasta el momento indican que en el genoma de un microorganismo suelen existir múltiples genes y *clusters* génicos que podrían estar implicados en la ruta baja de catabolismo de los intermediarios dicarboxílicos (piruvato, 3-hidroxipimelato) producto de la ruta de  $\beta$ -oxidación modificada. En *R. palustris* se ha identificado un *cluster* génico, *pimFABCDE*, organizado como un operón cuya expresión



**Figura 5. Organización génica de la ruta de degradación anaeróbica del benzoato en  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -proteobacterias.** *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 (NC\_005296), *Magnetospirillum* spp. [*M. magneticum* AMB-1 (NC\_007626); *M. magnetotacticum* MS-1 (AAAP000000000) y *Magnetospirillum* sp. TS-6 (AB-167726 y AB243675)], *Thauera aromatica* (AJ224959), *Azoarcus* spp. [*Azoarcus* sp. CIB (AF515816), *A. evansii* (AJ428529) y *Aromatoleum aromaticum* EbN1 (NC\_006513)], *Geobacter metallireducens* GS-15 (NC\_007517) y *Syntrophus aciditrophicus* SB (NC\_007759). Los genes han sido representados con flechas de diversos colores: rojo, genes que codifican benzoato-CoA ligasas; azul oscuro, genes que codifican las subunidades  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$  de la benzoil-CoA reductasa; rayado azul, genes que codifican las ferredoxinas asociadas a las benzoil-CoA reductasas; amarillo, genes KGOR; rayado negro, genes que codifican posibles óxido-reductasas dependientes de NADPH y ferredoxina; verde claro, genes que codifican enoil-CoA hidratasas; azul claro, genes que codifican hidroxiaxil-CoA deshidrogenasas dependientes de NAD<sup>+</sup>; naranja, genes que codifican oxoacil-CoA hidrolasas; negro, genes reguladores; verde oscuro, genes que codifican posibles acil-transferasas; marrón, posibles genes transportadores; rosa, genes que codifican la ciclohexanocarboxilato-CoA ligasa (AliA) y la ciclohexanocarboxil-CoA deshidrogenasa (AliB); punteado, genes pertenecientes a otras rutas catabólicas de compuestos aromáticos; blanco, genes de función desconocida. Dos rayas verticales separan los genes no adyacentes en el genoma.

se ve inducida cuando el microorganismo crece anaeróbicamente en benzoato (o pimelato), y en el que se encontrarían codificadas todas las actividades necesarias para transformar los ácidos dicarboxílicos hasta dar lugar a glutaril-CoA (Larimer *et al.*, 2004; Harrison y Harwood, 2005; VerBerkmoes *et al.*, 2006). Sin embargo, la ausencia de los genes *pim* en cepas mutantes de *R. palustris* no les impide el crecimiento anaeróbico en benzoato, por lo que muy probablemente otros parálogos de los genes *pim* presentes en el genoma podrían participar también en la ruta baja.

En *T. aromatica* los genes necesarios para la ruta central del benzoil-CoA se ubican en una agrupación génica de 7.9 kb, en la que se encuentran dos operones divergentes. El operón *bcr* agrupa en el mismo sentido de la transcripción a los genes codificantes de las cuatro subunidades de la benzoil-CoA reductasa (*bcrCBAD*), una ferredoxina (*fdx*), las actividades hidratasa (*dcb*)/deshidrogenasa (*bad*)/hidrolasa (*oah*) necesarias para la  $\beta$ -oxidación modificada del anillo alicíclico, y las *orf3* y *orf4* de función desconocida. El gen codificante de la benzoato-CoA ligasa (*bclA*) se localiza en otra posición del genoma, asociado al *cluster box*, responsable de la degradación aeróbica del benzoato (Schühle *et al.*, 2003). El operón divergente de la agrupación génica responsable de la ruta central del benzoil-CoA agrupa a los genes *korA* y *korB*, que codifican las dos subunidades necesarias para la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato óxido-reductasa, conocida como KGOR (*ketoglutarato oxido-reductase*), encargada de la regeneración del estado reducido de la ferredoxina acoplada a la benzoil-CoA reductasa (Dörner y Boll, 2002).

Los genes *bcr* necesarios para la degradación anaeróbica del benzoato también se han identificado en diferentes cepas del género *Magnetospirillum* (López-Barragán *et al.*, 2004b; Matsunaga *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2006), y exhiben una identidad de secuencia y organización génica similar ala de los genes *bcr* de *T. aromatica*. (Fig. 5). Además, el gen *bclA* también se localiza fuera del *cluster bcr* en las bacterias desnitrificantes del género *Magnetospirillum*.

El análisis del genoma de *G. metallireducens* GS-15 permitió detectar tres *clusters* relacionados con la degradación del benzoato y localizados dentro de una posible isla metabólica (Wischgoll *et al.*, 2005) (Fig. 5). El *cluster* IA codifica las diferentes subunidades (*bamB-I*) que forman parte de la benzoil-CoA reductasa propia de los microorganismos anerobios estrictos (Kung *et al.*, 2009) así como la actividad hidrolasa del anillo alicíclico, *bamA* (Kuntze *et al.*, 2008). En el denominado *cluster* II se han localizado los genes codificantes de la benzoato-CoA ligasa (*bamY*) (Wischgoll *et al.*,

2005) y de la deshidrogenasa (*bamQ*) (Wischgoll *et al.*, 2005) e hidratasa (*bamR*) (Peters *et al.*, 2007) implicadas en la  $\beta$ -oxidación modificada del producto de la reducción del benzoil-CoA. Además se identificó el denominado *cluster* IB, que contiene genes presuntamente implicados en la ruta baja de degradación del benzoato en este microorganismo anaerobio estricto (Wischgoll *et al.*, 2005). La diversidad de actividades enzimáticas que podrían estar codificadas en el *cluster* IB de *G. metallireducens*, sugiere que la ruta baja en los microorganismos anaerobios estrictos implica sistemas enzimáticos más complejos que en los microorganismos anaerobios facultativos (Carmona *et al.*, 2009).

El estudio del genoma de *S. aciditrophicus* revela la existencia de un *cluster* en el que se encontrarían los genes codificantes para la activación del benzoato, y la reducción y  $\beta$ -oxidación modificada subsiguientes (McInerney *et al.*, 2007). Todos estos genes muestran similitud con los de *G. metallireducens*, pero en lugar de estar dispersos en diferentes *clusters* se organizan en un único *cluster* (Fig. 5).

En los géneros *Azoarcus*/*Aromatoleum* se ha identificado un grupo de genes, *bzd*, responsable de la degradación anaeróbica del benzoato (López-Barragán *et al.*, 2004a; Rabus *et al.*, 2005) (Fig. 5). En el *cluster* *bzd* se halla un gen regulador (*bzdR*) seguido por el operón catabólico (*bzdNOPQMSTUVWXYZA*). Los genes *bzdNOPQ* codifican las subunidades de la benzoil-CoA reductasa, *bzdM* una ferredoxina presuntamente asociada a dicha reductasa y *bzdV* una hipotética óxido-reductasa implicada en la regeneración del estado reducido de BzdM. Las actividades necesarias para la  $\beta$ -oxidación modificada (hidratasa/deshidrogenasa/hidrolasa) estarían codificadas por los genes *bzdW*, *bzdX* y *bzdY*, respectivamente. Los productos de los genes *bzdW*, *bzdX* y *bzdY* muestran mayor similitud con las proteínas correspondientes de *T. aromatica* que con las de *R. palustris*, lo que sugiere que el tipo de  $\beta$ -oxidación que tendría lugar seguiría el mismo patrón que en *T. aromatica*, lo que se traduce en la formación de 3-hidroxi-pimelil-CoA como producto final. Merece la pena destacar que el gen codificante de la benzoato-CoA ligasa (*bzdA*) se ubica en el propio *cluster* *bzd* y no fuera de él, como ocurría en *T. aromatica*. En el extremo 3' del *cluster* *bzd* se han identificado seis genes que constituirían dos sistemas transportadores, uno de tipo ABC (*bzdB1B2B3B4B5*) y otro de tipo MFS (*bzdK*), posiblemente implicados en el transporte de benzoato (Rabus *et al.*, 2005) (Fig. 5).



## 2. Regulación de la expresión de los genes responsables de la biodegradación anaeróbica de compuestos aromáticos

---

La capacidad de los microorganismos para degradar compuestos aromáticos no se circunscribe exclusivamente a las actividades enzimáticas necesarias para la catálisis y el transporte, sino que depende en gran medida del control de la expresión de los genes responsables de estas actividades. Diferentes señales medioambientales influyen en la expresión de los genes relacionados con el catabolismo aromático como, por ejemplo, la tensión de oxígeno, la presencia o ausencia de luz, las variaciones en el pH, la propia disponibilidad del compuesto aromático, etc. La integración de todas estas señales y la modulación de las actividades necesarias para degradar los compuestos aromáticos son fundamentales para el éxito de los microorganismos en su medio. A pesar de que los sistemas reguladores pueden actuar a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, el primero de ellos es el más estudiado en los *clusters* catabólicos (Díaz y Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel y van der Meer, 2004; Cases y de Lorenzo, 2005a; Carmona *et al.*, 2008; Crosby *et al.*, 2010).

Las proteínas que controlan específicamente la expresión de los genes de catabolismo de compuestos aromáticos muestran una gran variedad en cuanto a su origen evolutivo, lo que sugiere que los genes catabólicos y los reguladores han sufrido un proceso evolutivo independiente (de Lorenzo y Pérez-Martín, 1996; Cases y de Lorenzo, 2005a).

Al igual que ocurre con las enzimas, los reguladores de las rutas catabólicas aeróbicas han sido mucho más estudiados que los de las rutas anaeróbicas. No obstante, los escasos trabajos relacionados con la regulación de las rutas anaeróbicas sugieren que los fundamentos que rigen los sistemas reguladores son en esencia los mismos en ambos tipos de metabolismo (Carmona *et al.*, 2009). Hasta la fecha sólo unos pocos reguladores específicos de rutas anaeróbicas se han caracterizado, pero se han propuesto otros asociados a *clusters* anaeróbicos identificados (Tabla 2).

Las bacterias en su medio natural están expuestas a un sinnúmero de estímulos y variables medioambientales que afectan a su crecimiento. Además de las señales físico-químicas (luz, temperatura, pH, etc.) variables en cualquier medio, la existencia de diferentes fuentes de carbono y la presencia/ausencia de oxígeno resultan de vital importancia para los microorganismos que poseen un alto potencial catabólico. Estas señales afectan a nivel global a todo el metabolismo bacteriano, ya que exigen una

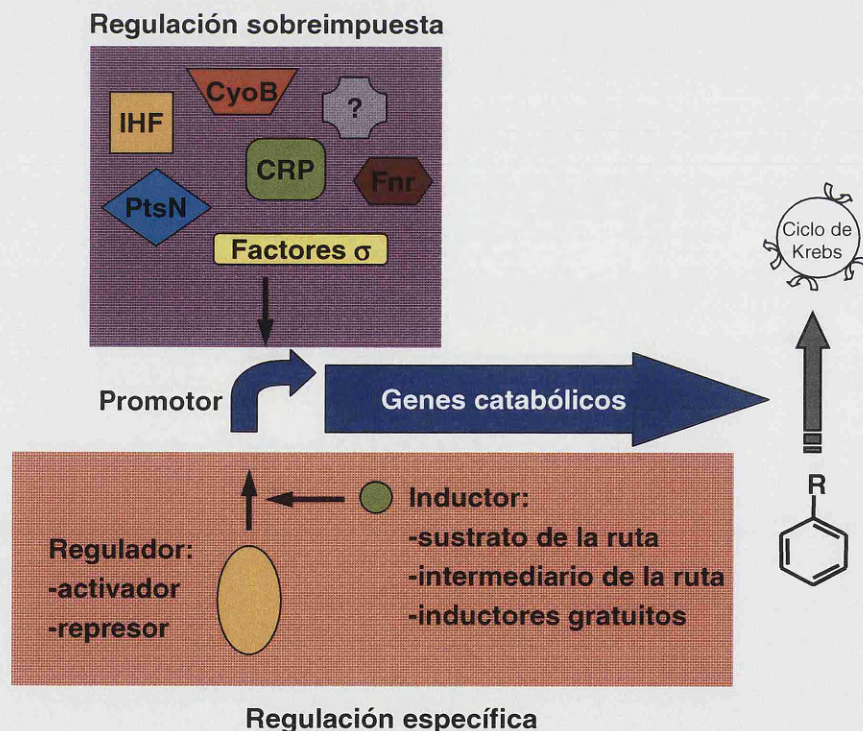
Regulador	Familia	Microorganismo	Actividad	Ruta	Nº Acceso
<b>Con efector específico</b>					
BzdR	BzdR	<i>Azotarcus</i> sp. CIB	Represora	Benzoato	AAQ08805
ORF11 (1)	XylR/DmpR	<i>T. aromatica</i> K172	Desconocida	Fenol	CAC12685
PdeR (1)	XylR/DmpR	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	Fenol	Q5P474
Gemet1542 (1)	XylR/DmpR	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocida	Tolueno	ABB31776
EbA324 (1)	XylR/DmpR	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	<i>p</i> -etilfenol	Q5P8R7
TutC1/B1	TCR (2)	<i>T. aromatica</i> T1	Activadora	Tolueno	AAD12187
					AAD12186
TdiS/R (1)	TCR (2)	<i>T. aromatica</i> K172	Activadora	Tolueno	CAA05048
					CAA05049
TdiS/R (1)	TCR (2)	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Activadora	Tolueno	CAI07156
					CAI07155
TdiS/R (1)	TCR (2)	<i>Azotarcus</i> sp. T	Activadora	Tolueno	AAK50369
					AAK50368
Tcs2/Tcr2 (1)	TCR (2)	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	Etilbenceno	CAI07438
					CAI07439
Tcs1/Tcr1 (1)	TCR (2)	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	Acetofenona	CAI07436
					CAI07437
BamV/W	TCR (2)	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Activadora	Benzoato	ABB32375
					ABB32374
HbaR	FNR/CRP	<i>R. palustris</i> CGA009	Activadora	<i>p</i> -hidroxibenzoato	AAF04013
CprK	FNR/CRP	<i>D. hafniense</i>	Activadora	<i>o</i> -clorofenol	AAI.87770
GcdR	LysR	<i>Azotarcus</i> sp. CIB	Activadora	Ruta baja del Benzoil-CoA	ABM69269
NicR (1)	LysR	<i>E. harkeri</i>	Desconocida	Nicotinato	ABC88392
PadR (1)	GntR	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	Fenilacetato	CAI09182
Rpd1521 (1)	GntR	<i>R. palustris</i> BisB5	Desconocida	Fenilacetato	ABE38758
ORF1 (1)	MarR	<i>T. aromatica</i> K172	Desconocida	<i>p</i> -hidroxibenzoato	O33817
PcmQ (1)	MarR	<i>G. metallireducens</i> GS-15	Desconocida	<i>p</i> -hidroxibenzoato	ABB32362
BadR	MarR	<i>R. palustris</i> CGA009	Activadora	Benzoato	AAC23923
Rpa1794 (1)	MarR	<i>R. palustris</i> CGA009	Desconocida	<i>p</i> -cumarato	Q6N8V9
EbA715 (1)	TetR	<i>A. aromaticum</i> Ebn1	Desconocida	<i>m</i> -hidroxibenzoato	CAI06487
Gmet1520 (1)	TetR	<i>G. metallireducens</i> AMB-1	Desconocida	Tolueno	ABB31754
BadM	Rfr2	<i>R. palustris</i> CGA009	Represora	Benzoato	O07465
<b>Dependientes de O<sub>2</sub></b>					
AadR	FNR/CRP	<i>R. palustris</i> CGA009	Activadora	Benzoato	B43334
				<i>p</i> -hidroxibenzoato	
AcpR	FNR/CRP	<i>Azotarcus</i> sp. CIB	Activadora	Benzoato	AAV81959

**Tabla 2. Proteínas reguladoras implicadas en el control de la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos** (Modificado de Carmona *et al.*, 2009). La Tabla esquematiza la principal información de interés referente a las proteínas reguladoras implicadas en la regulación del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, o a las que por su pertenencia a *clusters* génicos que codifican las actividades necesarias para la degradación de un compuesto aromático podrían tomar parte en su regulación (1). Se muestra la familia de reguladores a la que se adscribe la proteína, entre las que se incluyen los sistemas reguladores histidín-quinasa/regulador de respuesta (TCR, two-component regulatory system) (2). También se muestra el microorganismo al que pertenece el producto proteico, así como su actividad (en los casos en los que se conoce) y su número de acceso en GenBank.

reprogramación de la expresión de un amplio número de genes para hacer frente a los cambios medioambientales. Así, los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos fisiológicos de control que ejercen una regulación superpuesta a la regulación específica de los operones catabólicos, y que depende de los estados fisiológico y metabólico generales de la bacteria (Cases y de Lorenzo, 2001; Shingler, 2003; Prieto *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2008; Silva-Rocha *et al.*, 2011). En la Figura 6 se esquematizan los diferentes niveles de regulación que modulan el catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias. Se ha documentado la existencia de una serie de



reguladores que modulan redes globales de control que implican a numerosos reguladores específicos. Ese tipo de sistemas reguladores encaja en un esquema en el que existiría una conectividad y una integración de las señales percibidas en una red general de regulación transcripcional, lo que explica que unos cuantos reguladores específicos interactúen con un número limitado de genes y un número más reducido de reguladores globales influya en un gran número de genes (Cases y de Lorenzo, 2005a). La mayoría de los reguladores globales implicados en la degradación de compuestos aromáticos han sido descritos en rutas aeróbicas (Díaz y Prieto, 2000; Shingler, 2003; Tropel y van der Meer, 2004; Prieto *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Marqués *et al.*, 2006; Moreno y Rojo, 2008; Carmona *et al.*, 2008), pero existen ejemplos conocidos y caracterizados en procesos anaeróbicos, como las proteínas AadR de *R. palustris* (Dispensa *et al.*, 1992; Egland y Harwood, 1999) y AcpR de *Azoarcus* sp. CIB (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), que controlan la expresión génica en ausencia de oxígeno (Figs. 7 y 8).



**Figura 6. Esquema de los dos niveles de regulación transcripcional del catabolismo de compuestos aromáticos en bacterias.** En la degradación de un compuesto aromático, la interacción regulador/promotor es el mecanismo de regulación específico en presencia de la molécula inductora de la ruta (sombreado naranja). Un segundo nivel de control está constituido por la regulación global o sobreimpuesta (sombreado morado), en la que participan reguladores y factores transcripcionales como IHF (*Integration Host Factor*), CRP (*cAMP Receptor Protein*), Fnr (*Eumarate nitrate reductase regulator*), factores  $\sigma$  alternativos de la RNAP, CyoB (citocromo ó ubiquinol oxidasa), PtsN (proteína IIA<sub>Ntr</sub>), etc. (Adaptado de Díaz y Prieto, 2000).

## 2.1. Regulación específica de efector

La expresión de los *clusters* responsables de la degradación de compuestos aromáticos experimenta una estricta regulación dependiente de sus respectivos sustratos (Tropel y van der Meer, 2004; Wöhlbrand *et al.*, 2007). Los circuitos reguladores responsables de la regulación de *clusters* catabólicos anaeróbicos de compuestos aromáticos que han sido mejor estudiados son los del catabolismo del benzoato en los microorganismos modelo *R. palustris* CGA009 (fotótrofo) y *Azotarcus* sp. CIB (desnitrificante) (para revisión ver Carmona *et al.*, 2009).

### 2.1.1. Regulación de *cluster bad* de *R. palustris*

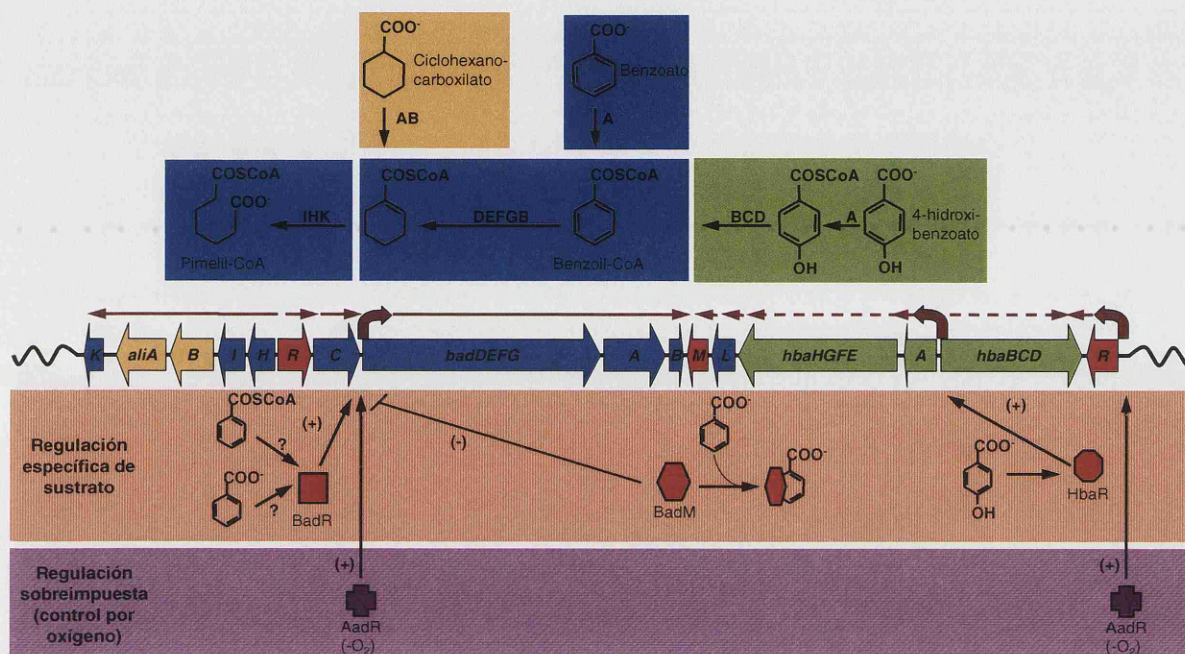
El *cluster* específico para la degradación anaeróbica del benzoato, *cluster bad*, de *R. palustris* CGA009 está organizado en, al menos, cinco operones diferentes: *badDEFGAB*, *badHlaliBAbadK*, *badC*, *badR* y *badM* (Egland *et al.*, 1997; Egland y Harwood, 1999; Pelletier y Harwood, 2000; Peres y Harwood, 2006; VerBerkmoes *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2008).

El producto del gen *badR*, perteneciente a la familia MarR de reguladores, actúa como activador transcripcional del promotor del operón *badDEFGAB* (Fig. 7), si bien todavía no se ha demostrado la unión específica de BadR a dicha región promotora (Egland y Harwood, 1999). Aunque no se conoce el efector específico que interactúa con BadR, se ha propuesto al benzoato o al benzoil-CoA como posibles inductores (Egland y Harwood, 1999).

El promotor del gen *badD* además de estar controlado por BadR está sujeto al control ejercido por AadR. El producto del gen *aadR* es un regulador que actúa en respuesta a la situación de anaerobiosis. AadR fue el primer regulador descrito relacionado con el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos (Dispensa *et al.*, 1992; Egland y Harwood, 1999). Mediante el análisis del fenotipo de cepas de *R. palustris* defectivas para *aadR* se estableció una relación con la producción de las CoA ligasas de benzoato y 4-hidroxibenzoato (Dispensa *et al.*, 1992). Estudios posteriores (Egland y Harwood, 1999) confirmaron la participación de AadR en la regulación de la expresión de rutas del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos en respuesta a la presencia o ausencia de oxígeno, dada la similitud de la proteína con el regulador Fnr de *E. coli* (Unden *et al.*, 1995; Unden *et al.*, 2002). La acción conjunta de BadR y AadR



permite unos niveles de expresión de los promotores catabólicos, que es imprescindible para el crecimiento en benzoato, de tal forma que cepas de *R. palustris* mutantes en *badR* y *aadR* son incapaces de crecer anaeróbicamente en benzoato (Egland y Harwood, 1999).



**Figura 7. Organización y regulación del cluster *bad-ali-hba* de *R. palustris*.** Los genes *ali*, *bad* y *hba* se muestran en amarillo, azul y verde, respectivamente. Las enzimas codificadas por estos genes, así como las reacciones catalizadas por éstas han sido recuadradas en los mismos colores. Los genes reguladores *badR*, *badM* y *hbaR* y sus correspondientes productos *BadR*, *BadM* y *HbaR* se muestran en color rojo (regulación específica de sustrato, recuadro sombreado en naranja). El regulador *AadR*, que no se encuentra codificado en este *cluster*, se muestra en morado (regulación dependiente de oxígeno, recuadro sombreado en morado). Las flechas marrones situadas encima del *cluster* indican que los genes que abarcan constituyen un operón (flechas sólidas) o un posible operón (flechas discontinuas). Los promotores de *badD*, *hbaA* y *hbaR* se representan como flechas curvas de color marrón. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

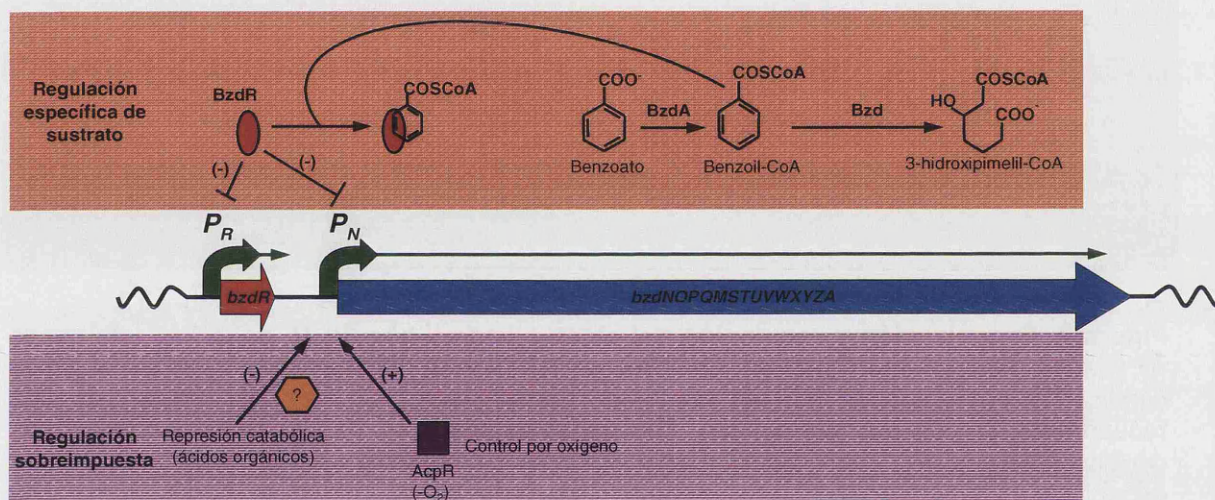
La regulación del *cluster bad* es aún más compleja, puesto que entra en juego un tercer regulador transcripcional que actúa sobre el promotor de *badD*, la proteína *BadM*. Los estudios realizados hasta la fecha revelan el papel represor de *BadM* (familia Rrf2) mediante su unión al promotor, y proponen al benzoato como la hipotética molécula inductora (Peres y Harwood, 2006).

No obstante, todavía quedan muchas incógnitas pendientes para completar la caracterización del sistema que regula el catabolismo anaeróbico del benzoato en *R. palustris*. Así, por ejemplo, se desconoce la regulación del operón *badH**aliB**AbadK*, sobre el que no parecen intervenir *BadR* ni *BadM*.



### 2.1.2. Regulación del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB

*Azoarcus* sp. CIB, la cepa bacteriana con la que se ha realizado esta Tesis Doctoral, posee el *cluster bzd* para la degradación anaeróbica del benzoato (López-Barragán *et al.*, 2004a). En este *cluster* los genes catabólicos *bzdNOPQMSTUVWXYZA*, se organizan en un operón regulado por el promotor  $P_N$ . En posición 5' del operón catabólico se encuentra el gen *bzdR*, que codifica la proteína reguladora BzdR. La proteína BzdR es un represor transcripcional del promotor  $P_N$  que inhibe la expresión de los genes catabólicos *bzd* cuando *Azoarcus* sp. CIB no está creciendo anaeróbicamente en benzoato y su inductor específico es el benzoil-CoA, intermediario central de la ruta (Barragán *et al.*, 2005). En la Figura 8 se puede observar un esquema del circuito regulador que controla la expresión del *cluster bzd* en *Azoarcus* sp. CIB.



**Figura 8. Organización y regulación transcripcional del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB.** Los genes se encuentran agrupados en dos operones, el gen regulador *bzdR* (rojo) y el operón catabólico *bzdNOPQMSTUVWXYZA* (azul), controlados por los promotores  $P_R$  y  $P_N$ , respectivamente. El promotor  $P_N$  está reprimido por la proteína BzdR (elipse roja). La activación del promotor  $P_N$  se produce por medio de la molécula inductora, benzoil-CoA, que se une a BzdR e impide la interacción de éste con el promotor. Algunas fuentes de carbono, tales como ácidos orgánicos no aromáticos, causan represión catabólica del promotor  $P_N$  por medio de un factor aún desconocido. La activación del promotor  $P_N$  en condiciones de anaerobiosis es dependiente de la proteína AcpR, codificada por un gen que no está ubicado en el *cluster bzd*. Los símbolos (-) y (+) indican represión y activación transcripcional, respectivamente.

La región operadora del promotor  $P_N$  sobre la que interactúa la proteína BzdR posee repeticiones de la secuencia TGCA incluidas en palíndromos más largos, y su posición solapante con la caja -10 para el reconocimiento por parte de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa justifica el papel de BzdR como represor transcripcional del promotor  $P_N$  (Barragán *et al.*, 2005). BzdR ejerce además una acción autorrepresora de su expresión, puesto que interactúa con el promotor que dirige su transcripción,  $P_R$ , impidiendo la transcripción del gen *mbdR* (Durante-Rodríguez *et al.*, 2008).

La proteína BzdR posee una arquitectura modular no descrita en la bibliografía previamente, lo que la convierte en el miembro que da nombre a una nueva subfamilia de reguladores transcripcionales (Barragán et al., 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010). BzdR posee un dominio amino-terminal similar al de los reguladores transcripcionales de la familia HTH-XRE, que se define por la presencia de un característico motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA equivalente a los de las proteínas Cro y CI del fago  $\lambda$  (Sauer *et al.*, 1982). El dominio carboxilo-terminal muestra similitud con enzimas que poseen actividad siquimato quinasa, las cuales catalizan la fosforilación de siquimato a 3P-siquimato consumiendo ATP como cosustrato en la ruta central de biosíntesis de compuestos aromáticos (Vogels y Van der Drift, 1976).

La proteína BzdR no es el único regulador que modula la expresión del promotor  $P_N$ . *Azotarcus* sp. CIB posee un gen, *acpR*, cuyo producto proteico muestra una elevada similitud de secuencia con la proteína Fnr de *E. coli* (Unden *et al.*, 1995; Unden *et al.*, 2002). La proteína AcpR de *Azotarcus* sp. CIB es un activador estrictamente necesario para la actividad de  $P_N$  y un mutante de *Azotarcus* sp. CIB defectivo para el gen *acpR* puede ser complementado con el gen *fnr* de *E. coli* de forma que se restaura el crecimiento anaeróbico en benzoato (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). AcpR participa en la regulación sobreimpuesta del *cluster bzd*, y es responsable del control por oxígeno (ver los párrafos siguientes).

### **2.1.3. Otros reguladores del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos**

#### **2.1.3.1. HbaR (*Rhodopseudomonas palustris*)**

El *cluster hba* de *R. palustris* codifica las actividades enzimáticas necesarias para la ruta periférica que convierte el 4-hidroxibenzoato en benzoil-CoA. La organización génica del *cluster hba* permite proponer la existencia de cuatro unidades transcripcionales: *hbaR* (operón regulador), *hbaA* (4-hidroxibenzoato-CoA ligasa), *hbaBCD* (4-hidroxibenzoil-CoA reductasa) y *hbaEFGH* (presunto transportador de tipo ABC) (Egland *et al.*, 1997) (Fig. 7).

La proteína HbaR reconoce y une 4-hidroxibenzoato como molécula efectora, activando la transcripción de *hbaA*, pero no parece controlar la expresión de los genes para la degradación aeróbica de 4-hidroxibenzoato (Egland y Harwood, 2000) (Fig. 7). La proteína HbaR pertenece a subfamilia Dnr dentro de la familia Fnr/Crp (Körner *et*

*al.*, 2003). Con la excepción de HbaR, todos los miembros del grupo Dnr son reguladores globales que controlan la expresión de genes implicados en procesos de desnitrificación (Egland y Harwood, 2000).

El hecho de que la expresión de *hbaA* no se active en condiciones aeróbicas presupone la existencia de un regulador sensible a la anaerobiosis (Egland y Harwood, 2000). Se ha detectado una posible caja de unión para la proteína Fnr de *E. coli* en el promotor del gen *hbaR*, lo que podría suponer la activación de la transcripción de *hbaR* en ausencia de oxígeno, mediada a través de un ortólogo de Fnr (Egland y Harwood, 2000). AadR es el candidato más plausible para ser el ortólogo de Fnr, puesto que pertenece a la superfamilia de reguladores Fnr/Crp y es necesario para la expresión de *hbaA* en respuesta a 4-hidroxibenzoato (Egland y Harwood, 2000). Esta red de control del gen *hbaA* basada en dos reguladores diferentes constituiría una estrategia para evitar fenómenos de regulación cruzada y lograr así un control específico más preciso bajo condiciones de ausencia de oxígeno (Egland y Harwood, 2000). Hasta la fecha se desconoce el mecanismo de control de la expresión de los operones *hbaBCD* y *hbaEFGH*.

#### **2.1.3.2. TdiSR (*Azoarcus* y *Thauera* spp.)**

En *T. aromatica* K172 los genes *tdiSR* se transcriben en el mismo sentido que los genes catabólicos *bss* implicados en la ruta periférica del tolueno, y se ha demostrado la capacidad de TdiR para unirse *in vitro* a la región 5' del operón *bss* (Leuthner *et al.*, 1998). El estudio de la degradación anaeróbica de tolueno en *Azoarcus* sp. T permitió identificar los genes *tdiSR*, adyacentes a los genes *bss* pero con orientación divergente respecto a estos últimos (Achong *et al.*, 2001). Experimentos posteriores en *T. aromatica* T1 revelaron que la mutación de *tutB1* (*tdiR*) impedía el crecimiento anaeróbico en tolueno de la cepa, así como la expresión de *tutE* (*bssD*), lo que concuerda con el papel activador de este regulador sobre los promotores catabólicos *bss* (Coschigano, 2000; Coschigano y Bishop, 2004).

Los genes *tdiSR* dan lugar a dos productos, la histidín-quinasa sensora TdiS que se encargaría del reconocimiento de la molécula inductora, y el regulador transcripcional TdiR, que sería activado (fosforilado) por TdiS (Leuthner *et al.*, 1998). La presencia de un dominio HTH característico de la familia de reguladores FixJ/NarL (Leuthner *et al.*, 1998) permite clasificar a TdiR dentro de este grupo de reguladores. Los dos

componentes del sistema regulador, TdiS y TdiR, muestran similitud significativa con proteínas homólogas que regulan las rutas catabólicas aeróbicas del tolueno (TodST) (Lau *et al.*, 1997) y del estireno (StySR) (Velasco *et al.*, 1998), por lo que todos ellos se pueden agrupar en una nueva subfamilia de sistemas reguladores de dos componentes relacionados con el control de rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Busch *et al.*, 2007).

## 2.2. Regulación sobreimpuesta

Las dos señales ambientales que constituyen modelos de estudio de la regulación sobreimpuesta son la presencia/ausencia de oxígeno y la disponibilidad de fuentes de carbono preferentes. Estas señales son integradas por reguladores transcripcionales globales que modifican la expresión de los *clusters* catabólicos anaeróbicos actuando de forma directa sobre ellos o indirectamente al modificar la expresión de reguladores transcripcionales específicos.

### 2.2.1. Regulación dependiente de oxígeno

El oxígeno representa uno de los principales factores medioambientales que controla la expresión de las rutas anaeróbicas de compuestos aromáticos. Como se ha señalado al comentar los principales componentes del sistema regulador del *cluster bad* para la degradación anaeróbica de benzoato en *R. palustris*, los genes *badDEFG* (codifica la benzoil-CoA reductasa) y *badA* (codifican la benzoato-CoA ligasa) experimentan una significativa reducción de su expresión en condiciones aeróbicas (Egland *et al.*, 1997; Peres y Harwood, 2006). En *T. aromatica* se detectó una importante disminución de la actividad benzoil-CoA reductasa cuando la bacteria se cultivaba en presencia de oxígeno (Heider *et al.*, 1998). En *M. magnetotacticum* sp. TS-6 los genes *bss* codificantes de la actividad bencilsuccinato sintasa encargada de la primera etapa del catabolismo anaeróbico del tolueno sólo se transcriben en presencia de tolueno en condiciones anóxicas (Shinoda *et al.*, 2005). Los estudios proteómicos realizados en *A. aromaticum* EbN1 (Wöhlbrand *et al.*, 2007) muestran la inducción de un bajo número de proteínas relacionadas con la degradación anaeróbica de benzoato cuando la bacteria se cultiva anaeróbicamente en esta fuente de carbono aromática.

No obstante, se ha documentado la expresión en condiciones aeróbicas de genes que codifican enzimas sensibles a la presencia de oxígeno, como por ejemplo la BCR de *M. magnetotacticum* TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005) o la bencilsuccinato sintasa de *Thauera* sp.

DNT-1 (Shinoda *et al.*, 2004). Por lo tanto, cada microorganismo parece haber adoptado una estrategia reguladora diferente para la expresión dependiente de oxígeno de los *clusters* catabólicos de compuestos aromáticos. La expresión de enzimas sensibles a oxígeno en condiciones aeróbicas puede explicarse como un cierto escape de la regulación específica o como un mecanismo de los microorganismos anaerobios facultativos para mantener niveles basales de ciertas enzimas ante la eventualidad de un cambio en la tensión de oxígeno (Fuchs, 2008). Otro ejemplo que justifica la ausencia de una regulación dependiente de los niveles de oxígeno se halla en *T. aromatica* y *Magnetospirillum* spp., microorganismos en los que una única benzoato-CoA ligasa inicia tanto el metabolismo aeróbico como el anaeróbico del benzoato (Schühle *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2006).

Como hemos indicado anteriormente, en *R. palustris* y *Azoarcus* sp. CIB existen proteínas ortólogas de Fnr, llamadas respectivamente AadR y AcpR, que juegan un papel esencial en la regulación de los *clusters* catabólicos de compuestos aromáticos dependiente de la presencia/ausencia de oxígeno (Dispensa *et al.*, 1992; Egland y Harwood, 1999; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006) (Figs. 7 y 8). A pesar de la similitud existente a nivel de secuencia aminoacídica y de mecanismo de acción entre AadR, AcpR y Fnr, parece que las tres proteínas no juegan el mismo papel en los correspondientes microorganismos hospedadores. La ausencia de Fnr en *E. coli* se caracteriza por producir efectos pleiotrópicos que conducen, por ejemplo, a la incapacidad de la cepa mutante para crecer empleando  $\text{NO}_3^-$  o fumarato como aceptores finales de electrones (Unden *et al.*, 1995). Sin embargo, la ausencia de AadR y de AcpR en *R. palustris* y *Azoarcus* sp. CIB, respectivamente, no parece acarrear ninguna desventaja que impida el crecimiento anaeróbico en fuentes de carbono no aromáticas. Este fenotipo podría ser indicativo de que AadR y AcpR son reguladores dependientes de oxígeno que están especializados en el control de la expresión de los genes responsables del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos, en lugar de ser reguladores globales que controlen la expresión de diferentes circuitos génicos, como ocurre con otros miembros de la superfamilia Fnr (Körner *et al.*, 2003). Esta aparente especialización de funciones podría ser característica de microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos como *R. palustris* y *Azoarcus* sp. CIB, en los que el análisis de su genoma revela la presencia de un importante número de genes reguladores de la superfamilia Fnr/Crp, mientras que en *E. coli* sólo se ha identificado un gen de este tipo, *fnr*, en su genoma (Körner *et al.*, 2003; Rabus, 2005).



Recientemente se ha identificado en *R. palustris* un nuevo regulador global, FixK, relacionado con el crecimiento en condiciones de microaerofilia y con la adaptación del metabolismo desde estas condiciones a la anoxia. La proteína FixK funciona en coordinación con un sistema sensor transmembrana codificado por los genes *fixJL*, y activa la expresión de *aadR* (Rey y Harwood, 2010). Además, se ha realizado un análisis transcriptómico que demuestra que AadR controla la expresión de otros genes además de regular los operones *bad* y *hba* (Egland y Harwood, 1999; Egland y Harwood, 2000), activando por ejemplo la expresión del *cluster pim* y reprimiendo la expresión de diversas dioxigenasas que emplean oxígeno como cosustrato para su catálisis (Rey y Harwood, 2010).

### **2.2.2. Regulación dependiente de fuentes de carbono alternativas (represión catabólica)**

La existencia en los hábitats bacterianos de diferentes fuentes de carbono que pueden ser empleadas por un mismo microorganismo convierte en una ventaja adaptativa a los mecanismos reguladores asociados a la elección selectiva del orden en el que se van a utilizar los diferentes sustratos. El término represión catabólica, o represión por catabolito, agrupa al conjunto de procesos reguladores que permiten que la expresión de las rutas catabólicas para la degradación de compuestos no preferenciales estén silenciadas cuando las bacterias están expuestas a una fuente de carbono preferencial, incluso cuando el inductor específico de la ruta está presente (Carmona, 2008; Cases y de Lorenzo, 2005a; Díaz y Prieto, 2000; Rojo y Dinamarca, 2004). Podemos considerar fuentes de carbono preferenciales a las que son de fácil asimilación e incorporación al metabolismo bacteriano, y que no requieren una inversión energética inicial muy elevada para su catabolismo, como sí ocurre con los compuestos aromáticos. El estudio del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos ha permitido identificar alguno de los mecanismos que participan en el proceso de represión catabólica (Collier *et al.*, 1996; Shingler, 2003; Prieto *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Marqués *et al.*, 2006; Ohtsubo *et al.*, 2006; Carmona *et al.*, 2008; Moreno y Rojo, 2008).

En *E. coli* la represión catabólica de las rutas de degradación de compuestos aromáticos está mediada por la proteína Crp, un activador global de la transcripción en presencia de AMPc (Prieto *et al.*, 2004). En el cromosoma de *P. putida* se ha hallado un gen cuyo producto génico muestra una alta similitud de secuencia con la proteína Crp de *E. coli* pero no parece estar relacionada con los procesos de represión catabólica (Suh *et*

*al.*, 2002; Morales *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Milanesio *et al.*, 2011). En bacterias no entéricas se han identificado varias proteínas relacionadas con la regulación por catabolito, como por ejemplo Crc (*Catabolite repression control*) (Morales *et al.*, 2004; Rojo y Dinamarca, 2004; Moreno y Rojo, 2008; Moreno *et al.*, 2010; Linares *et al.*, 2010), PtsN y PtsO (sistema fosfotransferasa relacionado con el metabolismo del nitrógeno; Marqués *et al.*, 2006; Pflüger y de Lorenzo, 2008; Pflüger-Grau *et al.*, 2011), algunas oxidasas terminales (CyoB) capaces de detectar el estado redox de la bacteria (Petruschka *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2006) y el regulador de respuesta BphQ (Ohtsubo *et al.*, 2006). Todos estos reguladores globales contribuyen a modular la expresión de rutas de acumulación de carbono y nitrógeno en la célula (Daniels *et al.*, 2010). No obstante, diferentes cepas de la misma especie pueden utilizar el mismo factor transcripcional para controlar distintas funciones celulares, lo que refleja que los sistemas reguladores han evolucionado independientemente de las funciones que regulan (Milanesio *et al.*, 2011).

En ocasiones la represión catabólica no se ejerce directamente sobre el promotor de los genes catabólicos, sino que se ejerce a través de la variación en los niveles de expresión de los reguladores específicos correspondientes. Un ejemplo de este sistema de control se ha descrito en *P. putida* Gpo1, cepa en la que cuando aumenta la represión catabólica de la ruta para la degradación de alcanos (genes *alk*) disminuye la expresión del gen regulador que codifica el activador transcripcional específico AlkS (Canosa *et al.*, 2000). En *P. putida* H se observa un fenómeno similar sobre la expresión de los genes *phl*, responsables de la degradación de fenol, mediante la modulación de la expresión del activador específico PhlR (Müller *et al.*, 1996).

A pesar de que los trabajos relativos a la represión catabólica son mucho más abundantes en el catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos, también se han documentado ejemplos en microorganismos anaerobios como *T. aromatica* y *Azoarcus* sp. CIB (Heider *et al.*, 1998; López-Barragán *et al.*, 2004a). En estos microorganismos la ruta para la degradación anaeróbica del benzoato está reprimida en presencia de ácidos orgánicos como succinato, malato y acetato. Por otro lado, compuestos que no pueden ser metabolizados por estas cepas bacterianas, como glicerol, fructosa y maltosa, no causan represión de la ruta. Los mecanismos moleculares de la represión catabólica en estos microorganismos anaeróbicos se desconocen hasta la fecha. Sólo los experimentos preliminares llevados a cabo en *Azoarcus* sp. CIB revelan que la represión catabólica

tiene lugar a nivel de la actividad del promotor catabólico  $P_N$  que controla la expresión de los genes  $bzd$ , pero no sobre el promotor  $P_R$  que controla la expresión del regulador BzdR (López-Barragán *et al.*, 2004a; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008).

### 3. La degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno

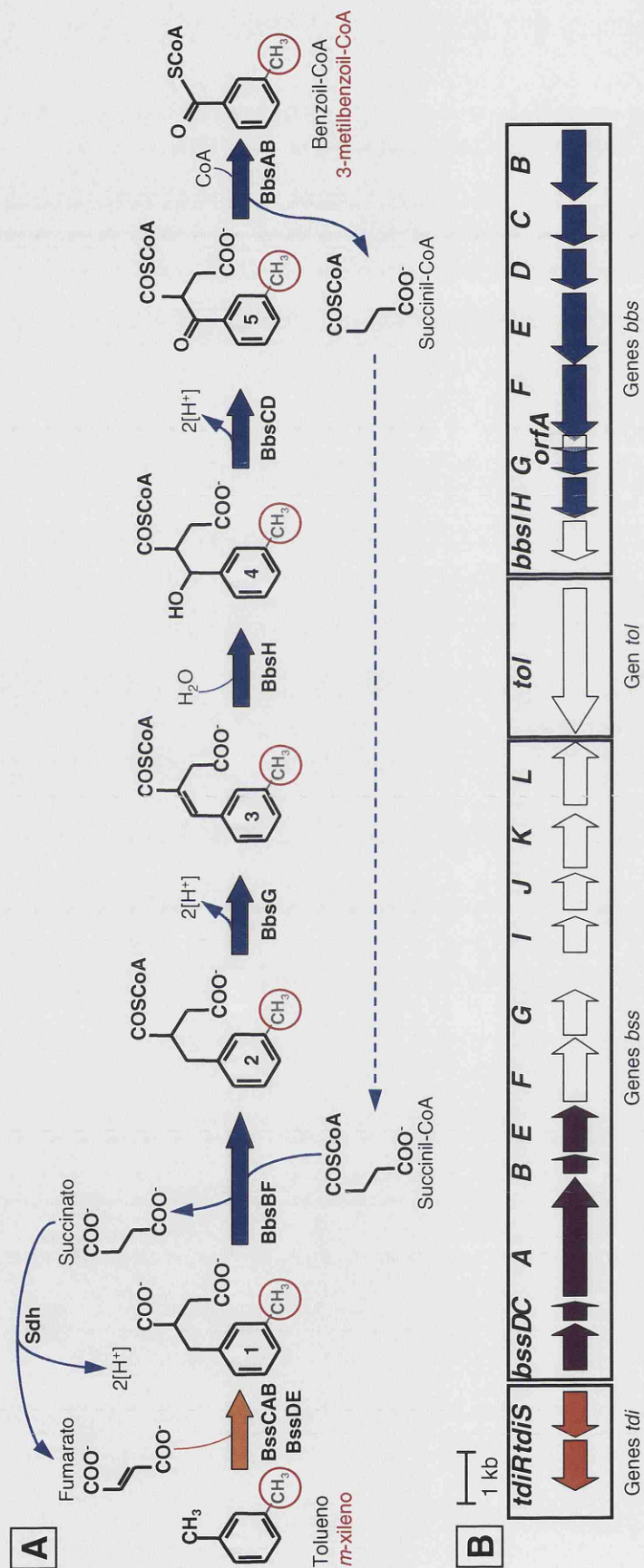
---

Uno de los grupos de compuestos aromáticos más contaminantes es el denominado BTEX, formado por los hidrocarburos benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (isómeros *orto*, *meta* y *para*). Estos compuestos aromáticos se producen en las industrias petroquímicas y se caracterizan por poseer una elevada hidrofobicidad y volatilidad. El extensivo uso de estos productos los convierte en unos contaminantes de primer orden, presentes por ejemplo en acuíferos, sedimentos, vertidos petrolíferos y productos derivados de la gasolina (Lin *et al.*, 2002). La biodegradación anaeróbica de los compuestos BTEX es la mejor estudiada en comparación con la de otros hidrocarburos aromáticos, como pueden ser los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) o heterocíclicos.

#### 3.1. La degradación anaeróbica de tolueno

Dentro de los compuestos BTEX el tolueno ha sido el más estudiado tanto en bacterias anaerobias facultativas como estrictas. El estudio del catabolismo anaeróbico del tolueno ha permitido identificar una nueva estrategia general de activación de hidrocarburos aromáticos (y también alifáticos) que se fundamenta en la adición covalente de dichos hidrocarburos a una molécula de fumarato. Los ácidos aromáticos que se generan son sustrato adecuado para reacciones similares a las de la  $\beta$ -oxidación en la formación, finalmente, de benzoil-CoA o sus derivados (Fuchs, 2008; Foght, 2008).

Los genes relacionados con la degradación anaeróbica del tolueno se identificaron inicialmente en *T. aromatica* K172 y se denominaron *bss* (*benzylsuccinate synthase*) y *bbs* ( *$\beta$ -oxidation of benzylsuccinate*). Los genes *bss* codifican la actividad responsable de la activación del tolueno a bencilsuccinato (Leuthner *et al.*, 1998; Coschigano *et al.*, 1998), mientras que los *bbs* dan lugar a los productos que canalizan la degradación del bencilsuccinato a benzoil-CoA (Leuthner y Heider, 2000) (Fig. 9).



**Figura 9. A) Esquema propuesto de la ruta periférica de degradación anaeróbica del tolueno y *m*-xileno.** Las moléculas dibujadas en negro constituyen la ruta periférica de degradación anaeróbica del tolueno. El *m*-xileno y sus intermediarios catabólicos se indican con el grupo metilo en posición meta rodeado por un círculo rojo. Las proteínas Bss y Bbs se indican junto a cada reacción enzimática. La flecha naranja indica la etapa catalizada por la bencilsuccinato sintasa BssCAB (auxiliada por las proteínas BssDE), que activa el hidrocarburo mediante su adición a una molécula de fumarato. Las flechas azules muestran las posibles implicadas en la  $\beta$ -oxidación del bencilsuccinato formado hasta bencilsuccinil-CoA. Sdh, representa la actividad succinato deshidrogenasa que transforma el succinato en fumarato. Los compuestos derivados del tolueno que aparecen en la figura son: (1) (R)-bencilsuccinato; (2) bencilsuccinil-CoA; (3) (E)-fenil-itaconil-CoA; (4) 2-[hidroxi(fenil)metil]succinil-CoA; (5) bencilsuccinil-CoA. Las moléculas derivadas del *m*-xileno que se generarían por la misma ruta son los correspondientes derivados metilados en posición *meta* de los compuestos citados anteriormente.

**B) Organización del cluster *bss-bbs* para la degradación anaeróbica del tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB.** Las flechas naranjas representan genes codificantes del sistema regulador bicomponente TdiRS. Las flechas moradas representan los genes que codifican las subunidades y proteínas activadoras de la bencilsuccinato sintasa, mientras que las azules muestran los genes presuntamente implicados en la  $\beta$ -oxidación del bencilsuccinato. Las flechas blancas representan genes de función desconocida.

El proceso se inicia con la adición por parte de la bencilsuccinato sintasa del grupo metilo del tolueno a una molécula de ácido fumárico, para dar lugar a (R)-bencilsuccinato. La bencilsuccinato sintasa es un complejo multiproteico ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) codificado por los genes *bssABC* en *T. aromatica* K172 y por sus ortólogos *tutDGF* en *T. aromatica* T1 (Li *et al.*, 2009). La mutación de cualquiera de estas subunidades impide la acción enzimática (Achong *et al.*, 2001; Coschigano, 2002). En presencia de oxígeno la subunidad  $\alpha$  se fragmenta, lo que conduce a una inactivación irreversible de la enzima (Leuthner *et al.*, 1998).

La  $\beta$ -oxidación del (R)-bencilsuccinato se inicia mediante su activación con CoA, mediada por el complejo catalítico BbsEF, responsable de la actividad succinil-CoA:(R)-bencilsuccinato CoA-transferasa (Leutwein y Heider, 2001). A continuación el producto del gen *bbsG* lleva a cabo una deshidrogenación que da lugar a (E)-fenil-itaconil-CoA (Leutwein y Heider, 2002). Los pasos restantes hasta la formación del benzoil-CoA no se han caracterizado bioquímicamente. La tercera enzima de la  $\beta$ -oxidación podría ser una hidroxiaxil-CoA hidratasa codificada por el gen *bbsH*, que transformaría el producto de la reacción anterior en 2-[hidroxi(fenil)metil]-succinil-CoA (Leuthner y Heider, 2000). En cuarto lugar una hidroxiaxil-CoA deshidrogenasa formada por dos unidades, o dos isoenzimas con actividad hidroxiaxil-CoA deshidrogenasa, codificadas por los genes *bbsCD* darían lugar a benzoil-succinil-CoA (Leuthner y Heider, 2000). La ruta periférica terminaría con la acción de una tiolasa, hipotéticamente codificada por los genes *bbsAB*, que escindiría el producto de la reacción anterior en benzoil-CoA y succinil-CoA (Kühner *et al.*, 2005).

Los genes responsables de la ruta periférica de degradación anaeróbica de tolueno en bacterias desnitrificantes de los géneros *Thauera*, *Azoarcus*/*Aromatoleum* y *Magnetospirillum* se ubican en una misma agrupación génica que incluye a los genes catabólicos *bss* (o sus correspondientes ortólogos *tut*) y *bbs* y a un sistema regulador de dos componentes *tdiSR* (subfamilia TodS/TodT) (Kube *et al.*, 2004) (Fig. 9B). La organización transcripcional de los genes *bss/tut* se ha estudiado en *T. aromatica* K172, *T. aromatica* T1 y *Azoarcus* sp. T (Coschigano, 2000; Achong *et al.*, 2001; Hermuth *et al.*, 2002). En *Azoarcus* sp. CIB se ha identificado el *cluster bbs-bss* completo, y se ha caracterizado su organización transcripcional, así como el sistema regulador específico mediado por el sistema de dos componentes TdiSR (Blázquez, 2009). En la cepa *T. aromatica* K172 existe además un control post-transcripcional de los genes *bss*, que

implica un procesamiento del RNA mensajero que da lugar a transcritos de diferente vida media, corta en el caso de *bssDCABE* y larga en el caso de *bssCABE*. Este mecanismo modularía los niveles de la bencilsuccinato sintasa BssCAB y de su activador BssD en la célula (Hermuth *et al.*, 2002).

El análisis del genoma de microorganismos anaerobios estrictos como *G. metallireducens* GS-15 ha permitido la identificación de genes que muestran similitud con *bss-bbs*, pero se han hallado diferencias en los sistemas reguladores asociados, que pertenecen a las familias XylR y TetR en lugar de mostrar similitud con TdiSR (Kühner *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2007) (Fig. 9B).

### 3.2. La degradación anaeróbica del *m*-xileno

Al comienzo de este trabajo se conocían diferentes cepas bacterianas capaces de emplear anaeróbicamente el *m*-xileno como única fuente de carbono y energía, tanto  $\beta$ -proteobacterias desnitrificantes como *Azoarcus toluovorans* Td15 (Fries *et al.*, 1994), *Azoarcus* sp. M (Hess *et al.*, 1997), *Azoarcus* sp. T (Krieger *et al.*, 1999; Achong *et al.*, 2001), *Thauera* sp. mXyN1 (Rabus y Widdel, 1995) y *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez, 2009),  $\delta$ -proteobacterias reductoras de sulfato como la cepa mXyS1 (Harms *et al.*, 1999), como la bacteria Gram-positiva reductora de sulfato *Desulfotomaculum* sp. OX39 (Morasch *et al.*, 2004). La ruta periférica para la degradación anaeróbica del *m*-xileno coincide con la ruta periférica del tolueno. El *m*-xileno se activa con ácido fumárico para dar lugar a 3-metilbencilsuccinato (Krieger *et al.*, 1999). La reacción está catalizada por la misma bencilsuccinato sintasa que activa al tolueno en *Azoarcus* sp. T (Achong *et al.*, 2001; Verfürth *et al.*, 2004). Las cepas de *Azoarcus* sp. CIB mutantes en los genes *bss* y *bbs* se muestran incapaces de crecer anaeróbicamente empleando tanto tolueno como *m*-xileno como fuentes de carbono (Blázquez, 2009), lo que confirma la implicación de la misma ruta periférica Bss-Bbs en el metabolismo anaeróbico del tolueno y *m*-xileno. La degradación del *m*-xileno a través de su ruta periférica común con el tolueno daría lugar a 3-metilbenzoil-CoA en lugar de a benzoil-CoA (Krieger *et al.*, 1999; Blázquez, 2009) (Fig. 9A).

### 3.3. La ruta central del 3-metilbenzoil-CoA

Como se ha indicado anteriormente, el 3-metilbenzoil-CoA se genera en la ruta periférica de la degradación anaeróbica del *m*-xileno (Fig. 9A) y es muy probablemente el

primer intermediario de la degradación anaeróbica del 3MBz (Carmona *et al.*, 2009). Los estudios llevados a cabo con *Azgarus buckelii* U120 han demostrado que el 3-metilbenzoil-CoA puede producirse como intermediario en otra ruta diferente, la responsable de la degradación anaeróbica del *o*-cresol (Rudolphi *et al.*, 1991). El mecanismo propuesto sugiere que el *o*-cresol podría sufrir una carboxilación que daría lugar a 4-hidroxi-3-metilbenzoato, un intermediario que se activaría a su correspondiente tioéster de CoA y posteriormente se deshidroxilaría a 3-metilbenzoil-CoA. A pesar de que el 3-metilbenzoil-CoA constituye, por lo tanto, un intermediario central en la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos metilados (Fig. 2), su ruta de degradación era desconocida al comienzo de esta Tesis Doctoral. El hecho de que cepas de *Azgarus* sp. CIB mutantes en la ruta central *bzd* o en la actividad glutaril-CoA deshidrogenasa (*gcdH*), esencial para la incorporación de los productos de la degradación del benzoil-CoA al metabolismo central bacteriano, puedan crecer anaeróbicamente empleando *m*-xileno como fuente de carbono (Blázquez *et al.*, 2008; Blázquez, 2009) apoya la hipótesis de la existencia de una ruta central y una ruta baja específicas para la degradación de 3-metilbenzoil-CoA y distintas de las ya caracterizadas para la degradación de benzoil-CoA.

La necesidad de una ruta central específica del 3-metilbenzoil-CoA, distinta de la ampliamente extendida ruta central del benzoil-CoA, permite explicar que si bien se han aislado numerosos microorganismos degradadores de tolueno sólo unos pocos sean capaces de mineralizar también *m*-xileno.

Dado que *Azgarus* sp. CIB es un microorganismo modelo para el estudio de las rutas catabólicas que permiten la degradación de compuestos aromáticos en condiciones anaeróbicas (López-Barragán *et al.*, 2004a; Barragán *et al.*, 2005; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006; Blázquez *et al.*, 2008; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008; Durante-Rodríguez *et al.*, 2010), es capaz de utilizar *m*-xileno como única fuente de carbono y energía en condiciones desnitrificantes (López-Barragán *et al.*, 2004a), y su genoma ha sido recientemente secuenciado, en esta Tesis Doctoral se ha procedido a la identificación y caracterización molecular de la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA en este organismo modelo.





## **II. OBJETIVOS**



Como se ha comentado en la *Introducción*, *Azoarcus* sp. CIB es un microorganismo modelo para el estudio del catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos. La capacidad de la cepa para crecer en diferentes compuestos contaminantes, la existencia de herramientas para su manipulación genética y la reciente secuenciación de su genoma facilitan la realización de estudios genéticos y bioquímicos en este microorganismo biodegradador.

Al inicio de esta Tesis Doctoral se había caracterizado la ruta periférica de degradación del tolueno y *m*-xileno, pero no se tenía ninguna información sobre la hipotética ruta central del 3-metilbenzoil-CoA que canalizaría el producto de la ruta periférica del *m*-xileno al metabolismo central bacteriano. También se desconocía la ruta periférica que podría activar 3MBz a 3-metilbenzoil-CoA. Ninguna de estas rutas había sido caracterizada hasta la fecha en ningún microorganismo.

En esta Tesis se propuso identificar los determinantes genéticos relacionados con la degradación del 3-metilbenzoil-CoA, caracterizar bioquímicamente sus pasos enzimáticos clave, e investigar los posibles sistemas reguladores que modularían su expresión. De esta forma, se definieron los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Identificar los genes responsables de la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA y la ruta periférica del 3MBz en *Azoarcus* sp. CIB (*cluster mbd*).
- **Objetivo 2:** Clonar los genes codificantes de las actividades enzimáticas clave de la ruta y caracterizar bioquímicamente sus productos proteicos.
- **Objetivo 3:** Estudiar la organización transcripcional de los operones que forman parte del *cluster mbd*.
- **Objetivo 4:** Caracterizar la regulación transcripcional específica del *cluster mbd*.
- **Objetivo 5:** Identificar la existencia de sistemas de regulación sobreimpuesta que modulen la expresión del *cluster mbd*.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas de bacterias que se han utilizado en este trabajo se detallan en la Tabla 3 junto con sus genotipos y características más relevantes.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4 donde se muestra el nombre de cada plásmido y sus características más relevantes.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se muestran en la Tabla 5. Todos los oligonucleótidos fueron adquiridos a Sigma-Genosys.

**Tabla 3. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo / Fenotipo	Referencia
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10B	I <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr, hsdRMS-mcrBC)$ , $\Phi80dlac\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> $\lambda$ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Life Technologies
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(r<sub>m</sub>m<sub>B</sub>)</i> , <i>gal</i> , <i>dcn</i> , $\lambda$ DE3 (portador del gen <i>t</i> de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>PlacUV5</i> )	Sambrook y Russell, 2001
MC4100	<i>araD139</i> , $\Delta(argF-lac)$ U169, <i>rpsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>flbB5301</i> , <i>deoC1</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	Casadaban, 1976
S17- $\lambda$ pir	Tp <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>hsdRM</i> +, RP4::2-Tc::Mu::Km, Tn7, $\lambda$ pir lisogénico	de Lorenzo y Timmis, 1994
<b><i>Azoarcus</i> sp. CIB</b>		
<i>Azoarcus</i> sp. CIB	Cepa silvestre degradadora de compuestos aromáticos	López-Barragán <i>et al.</i> , 2004
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdmbdO	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>mbdO</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdmbdY	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>mbdY</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdmbdA	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>mbdA</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdorff5	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>orf5</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdorff6	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>orf6</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdbzdN	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>bzdN</i>	López-Barragán <i>et al.</i> , 2004
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdmbdR	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>mbdR</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdmbdB1	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>mbdB1</i>	Este trabajo
<i>Azoarcus</i> sp. CIBdaapR	Cepa CIB mutante por inserción en el gen <i>aapR</i>	Durante-Rodríguez <i>et al.</i> , 2006

**Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo.**

Plásmido	Descripción	Referencia
<b>pK18mob</b>	Km <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , Mob <sup>+</sup> , <i>lacZ</i> , vector suicida para la construcción de mutantes por inserción mediante recombinación homóloga	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18bcrB	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> de 787 pb del gen <i>mbdO</i>	Este trabajo
pK18mbdY	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> de 709 pb del gen <i>mbdY</i>	Este trabajo
pK18mbdA	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> de 736 pb del gen <i>mbdA</i>	Este trabajo
pK18orf5	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> de 585 pb del gen <i>orf5</i>	Este trabajo
pK18orf6	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/XbaI</i> de 723 pb del gen <i>orf6</i>	Este trabajo
pK18mbdRnew	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>HindIII/EcoRI</i> de 524 pb del gen <i>mbdR</i>	Este trabajo
pK18mbdB1	Km <sup>r</sup> , derivado de pK18mob que incluye un fragmento <i>EcoRI/XbaI</i> de 728 pb del gen <i>mbdB1</i>	Este trabajo
<b>pUC18/19</b>	Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZ</i>	Sambrook y Russel, 2001
pUCmbdA	Ap <sup>r</sup> , derivado de pUC19 que contiene el gen <i>mbdA</i> bajo el control del promotor <i>Plac</i>	Este trabajo
pUCBZDA	Ap <sup>r</sup> , derivado de pUC18 que contiene el gen <i>bzdA</i> bajo el control del promotor <i>Plac</i>	López-Barragán <i>et al.</i> , 2004
<b>pET-29a</b>	Km <sup>r</sup> , vector de clonación e hiperexpresión, <i>oriColE1</i>	Novagen
pETmbdW	Km <sup>r</sup> , derivado de pET-29a que expresa la proteína MbdW con una fusión de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal	Este trabajo
pETmbdR	Km <sup>r</sup> , derivado de pET-29a que expresa la proteína MbdR con una fusión de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal	Este trabajo
<b>pSJ3</b>	Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>lacZ</i> , vector para la búsqueda de promotores con el gen testigo <i>lacZ</i> flanqueado con dianas de restricción <i>NofI</i>	Ferrández <i>et al.</i> , 1998
pSJ3P <sub>O</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P<sub>O</sub></i> con el gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3P <sub>B1</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P<sub>B1</sub></i> con el gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3P <sub>A</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P<sub>A</sub></i> con el gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSJ3P <sub>3R</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pSJ3 que contiene una fusión traduccional del promotor <i>P<sub>3R</sub></i> con el gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
<b>pIZ1016</b>	Gm <sup>r</sup> , derivado del vector de clonación y expresión de amplio espectro de hospedador pBBR1MCS-5 con el promotor <i>P<sub>tac</sub></i> y el gen <i>lacZ</i> de pMM40	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2003
pIZmbdA	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>mbdA</i> bajo el control de promotor <i>P<sub>tac</sub></i>	Este trabajo
pIZP <sub>O</sub>	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 en el que se ha sustituido el promotor <i>P<sub>tac</sub></i> por la fusión traduccional <i>P<sub>O</sub>::lacZ</i> procedente del vector pSJ3P <sub>O</sub>	Este trabajo
pIZP <sub>B1</sub>	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 en el que se ha sustituido el promotor <i>P<sub>tac</sub></i> por la fusión traduccional <i>P<sub>B1</sub>::lacZ</i> procedente del vector pSJ3P <sub>B1</sub>	Este trabajo
pIZP <sub>A</sub>	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 en el que se ha sustituido el promotor <i>P<sub>tac</sub></i> por la fusión traduccional <i>P<sub>A</sub>::lacZ</i> procedente del vector pSJ3P <sub>A</sub>	Este trabajo
pIZP <sub>3R</sub>	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 en el que se ha sustituido el promotor <i>P<sub>tac</sub></i> por la fusión traduccional <i>P<sub>3R</sub>::lacZ</i> procedente del vector pSJ3P <sub>3R</sub>	Este trabajo
pIZ-FNR*	Gm <sup>r</sup> , derivado de pIZ1016 que contiene el gen <i>fur*</i> bajo el control de promotor <i>P<sub>tac</sub></i> . El producto proteico resultante es una variante de la proteína Fnr insensible al efecto del oxígeno.	Durante-Rodríguez <i>et al.</i> , 2006
<b>pCK01</b>	Cm <sup>r</sup> , <i>oriSC101</i> , vector de clonación de bajo número de copias con <i>polylinker</i> flanqueado por dianas <i>NofI</i>	Fernández <i>et al.</i> , 1995
pCKmbdR	Cm <sup>r</sup> , derivado de pCK01 que contiene el gen <i>mbdR</i> bajo el control del promotor <i>Plac</i>	Este trabajo
<b>pJCD01</b>	Ap <sup>r</sup> , <i>oriColE1</i> , <i>polylinker</i> de pUC19 flanqueado por los terminadores <i>rpoC</i> y <i>rnnBT1T2</i>	Marschall <i>et al.</i> , 1998
pJCDP <sub>O</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pJCD01 que contiene un fragmento <i>ScaI/EcoRI</i> de 271 pb que incluye al promotor <i>P<sub>O</sub></i>	Este trabajo
pJCDP <sub>B1</sub>	Ap <sup>r</sup> , derivado de pJCD01 que contiene un fragmento <i>ScaI/EcoRI</i> de 251 pb que incluye al promotor <i>P<sub>B1</sub></i>	Este trabajo



**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados.** Las regiones subrayadas pertenecen a la diana de restricción incluida en el nombre del oligonucleótido.

<i>orf6</i> mut <i>Hind</i> III 5'	GGGAAGCTTCGGGAAAGGGATTGCGTGAGC	Fragmento interno de <i>orf6</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dorf6</i>
<i>orf6</i> mut <i>Xba</i> I 3'	GCTCTAGACGACCTGCAAAACCTGTTG	Fragmento interno de <i>orf6</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dorf6</i>
<i>orf5</i> mut <i>Hind</i> III 5'	CCCAAGCTTCGACCCGGCCTCCATG	Fragmento interno de <i>orf5</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dorf5</i>
<i>orf5</i> mut <i>Xba</i> I 3'	GCTCTAGAGCACCTTCGCCATCGATG	Fragmento interno de <i>orf5</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dorf5</i>
<i>mbdY</i> mut <i>Hind</i> III 5'	CCCAAGCTTCCTACAGCGTCGACATGCTCAAG	Fragmento interno de <i>mbdY</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdY</i>
<i>mbdY</i> mut <i>Xba</i> I 3'	GCTCTAGAGCTCTTGGTCAGGCTATCCGGG	Fragmento interno de <i>mbdY</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdY</i>
5' <i>ber</i> mut ( <i>Eco</i> RI)	GCGGATCCGTGAAAATCGGCGTAGCACTTCAG	Fragmento interno de <i>mbdO</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdO</i>
3' <i>ber</i> mut ( <i>Xba</i> I)	GCTCTAGACACGCTATCGGAACCCGACGCA	Fragmento interno de <i>mbdO</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdO</i>
<i>mbdA</i> mut <i>Hind</i> III 5'.2	CCCAAGCTTTGGCTGCTGCGGATGACGATTG	Fragmento interno de <i>mbdA</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdA</i>
<i>mbdA</i> mut <i>Xba</i> I 3'.2	GCTCTAGAGCCATCGCTATCGCGGTAATAGG	Fragmento interno de <i>mbdA</i> para construcción mutante <i>Azotarcus</i> sp. CIB <i>dmbdA</i>
<i>mbdA</i> <i>Hind</i> III 5'	CCCAAGCTTTGACCTAGCGCATTTGAGGAAACCGACC	Clonación <i>mbdA</i> en pUC19.
<i>mbdA</i> <i>Xba</i> I 3'	GCTCTAGATCAGTCATGAGCCGCATTTG	Incluye RBS del gen <i>mbdA</i> .
<i>mbdW</i> <i>Nde</i> I 5'	GGGAATTCCATATGACCGACACACCGCTTG AAGTC	Clonación <i>mbdW</i> en pET-29a.
<i>mbdW</i> <i>Not</i> I 3'	ATAAGAATGCGGCCGCGCGATTTTCCAACGCGGAGG	Clonación <i>mbdW</i> en pET-29a.
<i>orf6</i> R1	CTTGCCGCGCGGAGTAGTC	Extremo 3' de un fragmento de 536 pb comprendido entre <i>orf6</i> y <i>orf5</i> . Análisis transcripcional.
<i>orf5</i> F1	GCGATTGGTCATTGCACGTG	Extremo 5' de un fragmento de 536 pb comprendido entre <i>orf6</i> y <i>orf5</i> . Análisis transcripcional.
<i>orf5</i> R1	CCATGATTGCCGCCACATAAG	Extremo 3' de un fragmento de 485 pb comprendido entre <i>orf5</i> y <i>korB2</i> . Análisis transcripcional.
<i>korB2</i> F1	CGACTTGCGACGAGCTGAACG	Extremo 5' de un fragmento de 485 pb comprendido entre <i>orf5</i> y <i>korB2</i> . Análisis transcripcional.
<i>korA2</i> R1	GGCTTTCGCGACCGCTCG	Extremo 3' de un fragmento de 500 pb comprendido entre <i>korA2</i> y <i>mbdM</i> . Análisis transcripcional.
3MBzFed F1	CCACGTCTGTCCGGTAGACTCG	Extremo 5' de un fragmento de 500 pb comprendido entre <i>korA2</i> y <i>mbdM</i> . Análisis transcripcional.
3MBzFed R1	CACCGCAACTAGTGCACCTCATC	Extremo 3' de un fragmento de 791 pb comprendido entre <i>mbdM</i> y <i>mbdW</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdW</i> F1	GGAACGCCTCGACGAACTCG	Extremo 5' de un fragmento de 791 pb comprendido entre <i>mbdM</i> y <i>mbdW</i> . Análisis transcripcional.

<i>mbdX</i> R1	GCCACCGATGCCAGCGACAG	Extremo 3' de un fragmento de 704 pb comprendido entre <i>mbdX</i> y <i>orf4</i> . Análisis transcripcional.
<i>orf4</i> F1	CCGGAATCGACGTGTCGTATC	Extremo 5' de un fragmento de 704 pb comprendido entre <i>mbdX</i> y <i>orf4</i> . Análisis transcripcional.
<i>orf1</i> R1	CAGATTGCAGTGAAAATCGATTGC	Extremo 3' de un fragmento de 739 pb comprendido entre <i>orf1</i> y <i>mbdN</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdN</i> F1	GCAGTTTACCGCCGCGCTG	Extremo 5' de un fragmento de 739 pb comprendido entre <i>orf1</i> y <i>mbdN</i> . Análisis transcripcional.
<i>bcrB</i> R2	TGCGCCATCGTACACTCCTCG	Extremo 3' de un fragmento de 203 pb comprendido entre <i>P<sub>O</sub></i> y <i>mbdO</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdB1</i> R1	GGCAAAGTGGGCGGGCAGC	Extremo 3' de un fragmento de 278 pb comprendido entre <i>P<sub>B1</sub></i> y <i>mbdB1</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdB5</i> F1	GGGTAGCGCCAATCATCTGCC	Extremo 5' de un fragmento de 637 pb comprendido entre <i>mbdB5</i> y <i>mbdA</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdA</i> R2	CGTTGCCGTACCGGTTGACG	Extremo 3' de un fragmento de 637 pb comprendido entre <i>mbdB5</i> y <i>mbdA</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdR</i> -A3 ( <i>EcoRI</i> )	CGGAATTCGGCTTAGTCACCC	Extremo 3' de un fragmento de 365 pb comprendido entre <i>mbdR</i> y la región intergénica <i>mbdR</i> - <i>tdiR</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdR</i> -A5 ( <i>BamHI</i> )	CGGGATCCGAGGCAAATCCATT	Extremo 5' de un fragmento de 365 pb comprendido entre <i>mbdR</i> y la región intergénica <i>mbdR</i> - <i>tdiR</i> . Análisis transcripcional.
CIB +1P <sub>mbdO</sub> 3'	CATTTGACGTTCTCCTCCTCACTTG	Región intergénica <i>mbdO</i> - <i>mbdB1</i> . Primer extension promotor <i>P<sub>O</sub></i> .
CIB +1P <sub>mbdB1</sub> 3'	CATCTCTCCCTCCTGGACGATGAAG	Región intergénica <i>mbdO</i> - <i>mbdB1</i> . Primer extension promotor <i>P<sub>B1</sub></i> .
Interno <i>Pdiv</i> > <i>O</i> <i>ScaI</i> 5'.2	AAAAGTACTGGTATTACGGTAAAGTGCTCCA CG	Extremo 5' de la sonda <i>P<sub>O</sub></i> (271 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
<i>Pdiv</i> > <i>O</i> <i>EcoRI</i> 3'.2	CCGGAATTCCTTAATGGAAACGCGCTTCGC	Extremo 3' de la sonda <i>P<sub>O</sub></i> (271 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
Interno <i>Pdiv</i> > <i>B1</i> <i>ScaI</i> 5'.2	AAAAGTACTCGTGGAGCACTTACCGTAATAC CC	Extremo 5' de la sonda <i>P<sub>B1</sub></i> (251 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
<i>Pdiv</i> > <i>B1</i> <i>EcoRI</i> 3'	CCGGAATTCCTGCGCGCGGCACTATG	Extremo 3' de la sonda <i>P<sub>B1</sub></i> (251 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
5' <i>mbdR</i> mut2 ( <i>HindIII</i> )	GCGAAGCTTACCGTGCGACAACGAT	Fragmento interno de <i>mbdR</i> para construcción mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIBd <i>mbdR</i>
3' <i>mbdR</i> mut2 ( <i>EcoRI</i> )	CGGAATTCGCCATTGAGAAGTACCG	Fragmento interno de <i>mbdR</i> para construcción mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIBd <i>mbdR</i>
<i>mbdB1</i> mut <i>EcoRI</i> 5'	GGAATTCGGCCGCGAGGTTGAGTACG	Fragmento interno de <i>mbdB1</i> para construcción mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIBd <i>mbdB1</i>
<i>mbdB1</i> mut <i>XbaI</i> 3'	GCTCTAGACCTGCACCGCGTACACGTCG	Fragmento interno de <i>mbdB1</i> para construcción mutante <i>Azoarcus</i> sp. CIBd <i>mbdB1</i>
<i>PmbdO</i> <i>KpnI</i> 5'	GGGGTACCCATCTCTCCCTCCTGGACGATG AAG	Extremo 5' de un fragmento de 563 pb que se corresponde con la región intergénica <i>mbdO</i> - <i>mbdB1</i> . Clonación promotor <i>P<sub>O</sub></i> en pSJ3

<i>PmbdO</i> <i>XbaI</i> 3'	GCTCTAGAGGCATTGACGTTCTCCTCCTCACTTG	Extremo 3' de un fragmento de 563 pb que se corresponde con la región intergénica <i>mbdO-mbdB1</i> . Clonación promotor <i>P<sub>O</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdB1</i> <i>KpnI</i> 5'	GCGGTACCCATTGACGTTCTCCTCCTCACTTG	Extremo 5' de un fragmento de 563 pb que se corresponde con la región intergénica <i>mbdO-mbdB1</i> . Clonación promotor <i>P<sub>B1</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdB1</i> <i>XbaI</i> 3'	GCTCTAGAGGCATCTCTCCCTCCTGGACGATGAAG	Extremo 3' de un fragmento de 563 pb que se corresponde con la región intergénica <i>mbdO-mbdB1</i> . Clonación promotor <i>P<sub>B1</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdO</i> F1	GCTGGTATGTTGTGCGGAGTGG	Extremo 5' de un fragmento de 203 pb comprendido entre <i>P<sub>O</sub></i> y <i>mbdO</i> . Análisis transcripcional.
<i>PmbdB1</i> F1	CGCCGTTTTCCGCAATGACTG	Extremo 5' de un fragmento de 278 pb comprendido entre <i>P<sub>B1</sub></i> y <i>mbdB1</i> . Análisis transcripcional.
<i>mbdR</i> <i>SacI</i> 5'	ACGCGTCGACTGACCTAAGGAGGTAAATAATGAGAAAGCTGAACAAGAAGGAAG	Clonación <i>mbdR</i> en pCK01. Las bases con subrayado doble señalan una secuencia RBS consenso para <i>E. coli</i> acompañada de codones de fin en los tres marcos de lectura.
<i>mbdR</i> <i>PstI</i> 3'	AACTGCAGTCAGAATGTCGGATTTTTCAGG	Clonación <i>mbdR</i> en pCK01.
<i>mbdR</i> <i>NdeI</i> 5'	GGAATTCCATATGAGAAAGCTGAACAAGAAAGGAGCAGAG	Clonación <i>mbdR</i> en pET-29a.
<i>mbdR</i> <i>XbaI</i> 3'	CCGCTCGAGGAATGTCGGATTTTTCAGGAGGCC	Clonación <i>mbdR</i> en pET-29a.
Intergénica <i>mbdB5-mbdA</i> <i>KpnI</i> 5'	GGGGTACCAAGTTTTCATTATCTCTAGTACCGG	Extremo 5' de un fragmento de 238 pb de la región intergénica <i>mbdB5-mbdA</i> que incluye al promotor <i>P<sub>A</sub></i> . Clonación <i>P<sub>A</sub></i> en pSJ3
Intergénica <i>mbdB5-mbdA</i> <i>XbaI</i> 3'.2	GCTCTAGACCCATGGTCGGTTTCTCAATGCGC	Extremo 3' de un fragmento de 238 pb de la región intergénica <i>mbdB5-mbdA</i> que incluye al promotor <i>P<sub>A</sub></i> . Clonación <i>P<sub>A</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdR</i> <i>KpnI</i> 5'	GGGGTACCATGCTCGAAGTCAGGTATCCATC	Extremo 5' de un fragmento de 451 pb de la región intergénica <i>mbdR-ttdR</i> que incluye al promotor <i>P<sub>3R</sub></i> . Clonación <i>P<sub>3R</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdR</i> <i>XbaI</i> 3'	GCTCTAGAGGCATGATGTCTGGAGATGTTCC	Extremo 3' de un fragmento de 451 pb de la región intergénica <i>mbdR-ttdR</i> que incluye al promotor <i>P<sub>3R</sub></i> . Clonación <i>P<sub>3R</sub></i> en pSJ3
<i>PmbdA</i> <i>SacI</i> 5'	AAAAGTACTGAGGCCCCGCCAAGTTTTC	Extremo 5' de la sonda <i>P<sub>A</sub></i> (225 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
<i>PmbdA</i> <i>EcoRI</i> 3'	CGGAATTCCTCAATGCGCATCAACATAGTG	Extremo 3' de la sonda <i>P<sub>A</sub></i> (225 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA. Primer extensión <i>P<sub>A</sub></i>
<i>PmbdR</i> <i>SacI</i> 5'	AAAAGTACTCACAACCTCTTCACCACCAACGCG	Extremo 5' de la sonda <i>P<sub>3R</sub></i> (352 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA
<i>PmbdR</i> <i>EcoRI</i> 3'	CGGAATTCGTTCCAATGGATTTGCCTCTCGG	Extremo 3' de la sonda <i>P<sub>3R</sub></i> (352 pb) para experimentos <i>in vitro</i> de interacción proteína-DNA. Primer extensión <i>P<sub>3R</sub></i>
F24	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Secuenciación fragmentos DNA clonados en plásmidos que portan el gen <i>lacZα</i>

R24	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	Secuenciación fragmentos DNA clonados en plásmidos que portan el promotor <i>Plac</i> o derivados
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que contienen el promotor T7
T17	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Secuenciación fragmentos de DNA clonados en plásmidos que contienen el terminador transcripcional T7
5' POL III HK	GGACGCAGTCITTTGCGTGGAAC	Extremo 5' de un fragmento interno de 220 pb del gen <i>house-keeping dnaE</i> , codificante de la subunidad $\alpha$ de la DNA polimerasa III
3' POL III HK	GTGCGTCAAAGTCGCTGCTGTCC	Extremo 3' de un fragmento interno de 220 pb del gen <i>house-keeping dnaE</i> , codificante de la subunidad $\alpha$ de la DNA polimerasa III

## 2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0.2  $\mu$ m de diámetro. Para los crecimientos de *E. coli* y *Aerobius* sp. C1B se utilizaron diferentes medios de cultivo cuya composición aparece reseñada a continuación.

### 2.1. Medios de cultivo empleados para *Escherichia coli*

El medio rico empleado fue *Lysogeny Broth* (LB) (Sambrook y Russell, 2001; Bertani, 2004). Los cultivos de *E. coli* en medio sólido se realizaron con medio LB complementado con agar al 1.5% (masa/volumen). En los casos en los que se consideró necesario, se añadió 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 0.08 mM, así como isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM.

El medio mínimo empleado para *E. coli* fue M63 (Miller, 1972), al que se añadió agar al 1.5% (masa/volumen) para los crecimientos en medio sólido. El medio mínimo se complementó con glicerol (30 mM) como fuente de carbono, así como con las vitaminas y aminoácidos necesarios para cada cepa a las concentraciones recomendadas por Gerhardt *et al.* (1994). Para los cultivos en condiciones anóxicas se añadió KNO<sub>3</sub> 10

mM como aceptor final de electrones. Cuando fueron requeridos, los antibióticos se utilizaron a las concentraciones que se indican en el apartado 2.3.

## 2.2. Medios de cultivo empleados para *Azoarcus* sp. CIB

El medio mínimo empleado en este trabajo para cultivar las cepas de *Azoarcus* sp. CIB está basado en el medio basal MA (pH 7.5), cuya composición se detalla a continuación:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.33 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2 g
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.11 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g
- $\text{CaCl}_2$  0.04 g
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada (hasta 1 l)

Este medio basal fue suplementado con una solución de elementos traza (pH 6.5), cuya composición (1000x) se detalla a continuación:

- Ácido nitrilotriacético (NTA) 1.5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3.0 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 g
- $\text{NaCl}$  1.0 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18 g
- $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.3 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g
- $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.02 g
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.01 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.025 g
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada (hasta 1 l)

También se suplementó el medio MA con una solución de vitaminas cuya composición (1000x) es la siguiente:

- Biotina 20 mg
- Piridoxina-HCl 10 mg
- Riboflavina 50 mg
- D-Pantotenato cálcico 50 mg
- Ácido *p*-aminobenzoico 50 mg
- Ácido fólico 20 mg
- Tiamina-HCl·2H<sub>2</sub>O 50 mg
- Ácido nicotínico 50 mg
- Vitamina B<sub>12</sub> 50 mg
- H<sub>2</sub>O destilada (hasta 1 l)

Para el crecimiento anaeróbico de *Azotarcus* sp. CIB se añadió KNO<sub>3</sub> 10 mM, como aceptor final de electrones, al medio MC (medio basal complementado con vitaminas y elementos traza). Además, para asegurar el ambiente reductor, se añadió al medio MC una solución de sulfuro ferroso a una concentración final de 0.044 mg/ml.

### 2.3. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones 1000 veces concentradas en agua, excepto el cloranfenicol y la rifampicina que se disolvieron en etanol 100% y en DMSO 100%, respectivamente. Estas soluciones se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican:

- Ampicilina (Ap) 100 µg/ml
- Cloranfenicol (Cm) 34 µg/ml
- Kanamicina (Km) 50 µg/ml
- Rifampicina (Rf) 50 µg/ml
- Gentamicina (Gm) 7.5 µg/ml

### 2.4. Obtención de condiciones anaeróbicas en los medios de cultivo

Para obtener condiciones de anaerobiosis, el medio de cultivo así como las soluciones de elementos traza, nitrato potásico, sulfuro ferroso y todos los compuestos que fueron utilizados como fuente de carbono, se dispensaron en frascos de vidrio, los

cuales se taparon con tapones de goma y se sellaron con arandelas de aluminio. A través del tapón de goma se inyectó una aguja conectada a un depósito de nitrógeno (Air Liquide), permitiendo pasar un flujo de este gas al medio líquido durante varios minutos con el objeto de eliminar el oxígeno. Finalmente, todos los frascos fueron autoclavados. Para obtener una solución anaeróbica y estéril de vitaminas (las cuales son sensibles al calor) se realizó la misma operación descrita anteriormente pero con frascos de vidrio vacíos en los que, después de ser esterilizados por autoclave, se inyectó la solución de vitaminas mediante una jeringa conectada a un filtro estéril Millipore (de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro). Una vez preparadas estas soluciones, fueron añadidas al medio basal MA para obtener así el medio MC complementado con las correspondientes fuentes de carbono. Tanto la filtración de las soluciones de vitaminas como la inoculación de los medios de cultivo con las distintas cepas bacterianas, se realizaron en una cámara de anaerobiosis (Forma Scientific).

## 2.5. Condiciones de cultivo

Para los cultivos aeróbicos las cepas de *E. coli* y *Azotarcus* sp. CIB se cultivaron a 37 y 30 °C, respectivamente, con una agitación de 250 rpm. Ambas estirpes bacterianas fueron incubadas a 30 °C sin agitación para su crecimiento anaeróbico. Cuando se utilizaron compuestos aromáticos como fuente de carbono, éstos fueron añadidos al medio MC a una concentración de 3 mM, si no se especifica otra concentración. El *m*-xileno se añadió a una concentración de 250 mM en 2 ml de una fase orgánica de 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano (HMN) que fue añadida al medio de cultivo (15 ml). Atendiendo al coeficiente de reparto octanol/agua del *m*-xileno ( $K_{ow} = 3.2$ ), la concentración del compuesto en la fase acuosa cuando se añade a una concentración de 250 mM en HMN es de 0.15 mM. Las fuentes de carbono no aromáticas, como por ejemplo sales de ácidos orgánicos (succinato, glutarato, etc.) y casaminoácidos, fueron añadidos a los medios de cultivo en una relación 0.2% (m/v) salvo que se indique lo contrario.

El crecimiento de los cultivos fue monitorizado midiendo la absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-260. La morfología celular se analizó con un microscopio de contraste de fase Nikon OPTIPHOT-2. La desnitrificación en cultivos anaeróbicos fue monitorizada midiendo los niveles de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  con el Test Nitrates (Merck). El consumo de benzoato en el medio de cultivo

matenidos y métodos

fue monitorizado espectrofotométricamente a 273 nm tras la acidificación del medio con HCl.

## 2.6. Conservación de las cepas bacterianas

Durante cortos períodos de tiempo (inferiores a un mes) *E. coli* se conservó a 4 °C en placas de medio LB o de medio mínimo. Los cultivos anaeróbicos de *Azotarcus* sp. CIB se conservaron adecuadamente durante un periodo aproximado de un mes a 4 °C en viales de vidrio. Para su conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 15% (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

## 3. Técnicas de manipulación de DNA y RNA

---

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Russell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. La DNA ligasa T4 y la RNA polimerasa utilizada en los ensayos de transcripción *in vitro* (*E. coli* RNA Polymerase Holoenzyme 1 U/μl) fueron suministradas por USB. La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron mediante los productos *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene) o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

### 3.1. Purificación de DNA

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante el uso de *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche). Para obtener mayores volúmenes de preparaciones plasmídicas, se utilizó el *Plasmid Midi Kit* (Qiagen). El DNA cromosómico se extrajo empleando el procedimiento descrito por Wilson (1997).

### 3.2. Purificación de RNA

La purificación del RNA se realizó resuspendiendo las células bacterianas en una solución de lisozima 50 mg/ml (Sigma) en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). El RNA total del cultivo se obtuvo mediante el *RNeasy Mini kit* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del proveedor.



Para la eliminación del DNA contaminante se empleó el *DNAse and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante.

### 3.3. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)

La amplificación del DNA se realizó en un equipo *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y la polimerasa *Pfu*, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, oligonucleótidos 0.5  $\mu\text{M}$  y dNTPs 0.25 mM. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

### 3.4. Secuenciación de DNA

#### 3.4.1. Secuenciación automática

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *ABI Prism 37 automated DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc), en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA gestionado por la empresa Secugen S. L. en el Centro de Investigaciones Biológicas. Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Las reacciones se llevaron a cabo con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Perkin-Elmer).

#### 3.4.2. Secuenciación manual

En el caso concreto de los experimentos de extensión por cebador (*primer extension*), la secuenciación del DNA patrón se llevó a cabo según el método de terminación de la polimerización por didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) utilizando el *T7 Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech), y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  (6000 Ci/mmol 20mCi/ml; Perkin-Elmer) como desoxinucleótido trifosfato marcado radiactivamente, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

### 3.5. Determinación del sitio de inicio de la transcripción

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral se determinó el punto de inicio de la transcripción (+1) de cuatro promotores:  $P_O$ ,  $P_{B1}$ ,  $P_A$  y  $P_{3R}$ . Para ello se empleó la técnica de extensión por cebador o *primer extension*. La extensión se realiza mediante un cebador

que hibrida con el mRNA en una posición cercana al supuesto punto de inicio de la transcripción. En la Tabla 5 se indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Para la determinación del punto de inicio de la transcripción de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  se empleó la cepa *Azotarcus* sp. CIB. En el caso de los promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$  se realizó un primer intento con la cepa *Azotarcus* sp. CIB, pero el nivel de actividad de los promotores no permitía la detección de la posición +1, por lo que finalmente se recurrió a las cepas *Azotarcus* sp. CIB (pIZP<sub>A</sub>) y *Azotarcus* sp. CIB (pIZP<sub>3R</sub>), en las que se expresaban los promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$ , respectivamente, en un vector multicopia derivado de pIZ1016 (Tabla 4). Las cepas se cultivaron anaeróbicamente en medio MC complementado con benzoato o 3MBz, con ambos compuestos a una concentración final 3 mM, hasta que la absorbancia del cultivo a 600 nm ( $A_{600}$ ) alcanzó un valor de 0.3. A partir de este cultivo se extrajo el RNA total tal y como se indica en el apartado 3.2.

Las reacciones de extensión se llevaron a cabo con la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV 10U/ $\mu$ l; Promega) y 15  $\mu$ g de RNA total, tal y como se ha descrito previamente (Martín *et al.*, 1995). Los oligonucleótidos CIB +1P<sub>mblC</sub> 3', CIB +1P<sub>mblB1</sub> 3', *PmbdA* EcoRI 3' y *PmbdR* EcoRI 3' (Tabla 5) se marcaron con  $^{32}$ P en su extremo 3' con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (New England Biolabs 10 U/ $\mu$ l) empleando como donador del grupo fosfato [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml; Perkin-Elmer). Con el fin de determinar el tamaño de los productos obtenidos en la reacción de extensión, se llevaron a cabo en paralelo reacciones de secuenciación de los plásmidos pSJ3P<sub>O</sub>, pSJ3P<sub>B1</sub>, pIZP<sub>A</sub> y pIZP<sub>3R</sub>, con los mismos oligonucleótidos detallados más arriba.

Los productos obtenidos en las reacciones se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6% - urea 8 M. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham GE) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

### 3.6. Ensayos de retrotranscripción (RT-PCR)

Una vez purificado el RNA y eliminado el DNA contaminante, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Cada reacción de retrotranscripción (20  $\mu$ l) contenía 400 ng de RNA, 200 U de transcriptasa reversa, ditioneitol (DTT) 10 mM, dNTPs 0.5 mM y 5 mM de pd(N)<sub>6</sub> random hexamer 5' phosphate (Amersham Biosciences).

Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder utilizar las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en las que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. El RNA y los hexámeros se incubaron a 65 °C durante 5 min para la hibridación, y tras enfriar en hielo se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó a 42 °C durante 2 h. La reacción se finalizó con una incubación de 15 min a 70 °C. Se empleó 1 µl del cDNA así obtenido como molde para la PCR posterior. En los casos en los que fue necesario, el cDNA se diluyó 1/10 previamente a la PCR. El cDNA se amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a concentración final 0,5 µM y 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools). En cada una de las reacciones de PCR se incluyó un control con 1 µl de la reacción de RT en la que no se empleó la transcriptasa reversa. Con este control se corroboró que no existía ninguna banda de amplificación indicativa de que la preparación de RNA contuviera DNA contaminante. El volumen total de la reacción de PCR fue de 50 µl y 30 fueron los ciclos de amplificación.

En los casos en los que se comparó la expresión génica en diferentes condiciones metabólicas se empleó como patrón interno en las reacciones de PCR la pareja de oligonucleótidos 5' POL III HK / 3' POL III HK. Esta pareja de oligonucleótidos amplifica una región interna del gen *dnaE*, codificante de la subunidad  $\alpha$  de la DNA polimerasa III, cuya expresión se ha demostrado constitutiva a lo largo del ciclo celular (Noller *et al.*, 2003).

## 4. Experimentos de transferencia genética

### 4.1. Transformación de células de *E. coli* mediante choque térmico y electroporación

Las células de *E. coli* se transformaron utilizando dos procedimientos distintos: choque térmico y electroporación. La transformación por choque térmico requiere la preparación previa de células competentes con RbCl (Sambrook y Rusell, 2001). La transformación por electroporación (Wirth *et al.*, 1989) se llevó a cabo en un equipo Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad), según las recomendaciones del fabricante.

## 4.2. Transformación de células de *Azoarcus* sp. CIB mediante electroporación

Empleando como preinóculo un cultivo anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en benzoato, se prepara un cultivo aeróbico de 300 ml de medio MC complementado con succinato 0.2% (m/v) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. El cultivo se incuba 12 h en agitación a 30 °C hasta que alcanza una absorbancia a 600 nm de ~0.2, y las células se recogen por centrifugación (1500g, 25 min) a 4 °C. A continuación, las células se resuspenden en 8 ml de glicerol 10% y se lavan 2 veces centrifugándolas a 4 °C (1300g, 15 min). Finalmente, las células se resuspenden en 50 µl de glicerol 10% y se electroporan con 1 µg de DNA plasmídico en un electroporador Gene Pulser/Pulse Controller (Bio-Rad) a 2.5 kV, 200Ω y 25 µFa. Las células se traspasan a medio MC complementado con glutarato 10 mM y se incuban 1 h a 30 °C en agitación. Finalmente las bacterias transformantes se seleccionan en medio sólido MC complementado con glutarato 10 mM más el antibiótico correspondiente.

## 4.3. Transferencia de plásmidos mediante conjugación

### 4.3.1. Protocolo de conjugación

Los plásmidos se movilizaron a *Azoarcus* sp. CIB y sus derivados por conjugación biparental utilizando la cepa *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir como donador, según el protocolo establecido por de Lorenzo y Timmis (1994) con algunas modificaciones. Se utilizó una cantidad de células de la cepa donadora *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir correspondiente a una  $A_{600}$  de 5, y de la cepa receptora (*Azoarcus* sp. CIB) cultivada en medio mínimo MC con succinato 0.2% se utilizó una cantidad de células correspondiente a una  $A_{600}$  de 35. Los exconjugantes fueron seleccionados aeróbicamente en placas de medio mínimo MC más glutámico 10 mM (contraselección de la cepa donadora) y el correspondiente antibiótico cuya resistencia porta el plásmido y, en su caso, el de la cepa receptora (cuando se emplearon derivados de *Azoarcus* sp. CIB).

Este protocolo de conjugación se empleó tanto para la transferencia de plásmidos replicativos como de plásmidos suicidas.

### 4.3.2. Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga en *Azoarcus* sp. CIB

El vector elegido para la construcción de mutantes por recombinación homóloga en *Azoarcus* sp. CIB fue el plásmido pK18*mob* (Tabla 4), que se comporta como una plásmido suicida en esta cepa. Fragmentos internos (con un tamaño aproximado de 700 pb) de los genes que se deseaban mutar se clonaron en el vector pK18*mob*, dando lugar a los plásmidos derivados que aparecen en la Tabla 4. Estos vectores se introdujeron en la cepa donadora *E. coli* S17-1 $\lambda$ *pir* mediante transformación por choque térmico o electroporación. Las cepas derivadas de *E. coli* S17-1 $\lambda$ *pir* que se obtuvieron fueron utilizadas para la realización de conjugaciones biparentales con *Azoarcus* sp. CIB tal y como se detalla en el apartado 4.3.1 de esta sección. Debido a la naturaleza suicida del vector pK18*mob* en *Azoarcus* la única forma de que los exconjugantes sobrevivan a la presión selectiva de la kanamicina (cuya resistencia porta el plásmido) es que se haya producido una recombinación homóloga entre la región génica clonada en el vector y la copia cromosómica del gen, de tal forma que el plásmido se inserta en el interior de éste impidiendo la formación de un transcrito completo de la ORF. Para comprobar si la recombinación se ha producido en las cepas exconjugantes se valida mediante PCR que el gen diana esté truncado, comprobando la imposibilidad de la amplificación de una banda de DNA equivalente al tamaño del gen en la estirpe silvestre y la formación de fragmentos de DNA recombinantes constituidos por parte del gen truncado y parte del plásmido insertado.

## 5. Técnicas de manipulación de proteínas

---

### 5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida en placa (PAGE) a una concentración del 10-15%. Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 mA (corriente constante), utilizando un electrolito que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Las

proteínas de los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular (fosforilasa B, 97.4 kDa; BSA, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina, 21.5 kDa) se adquirieron en Bio-Rad.

## 5.2. Sobreproducción y purificación de proteínas

### 5.2.1. Sobreproducción y purificación de MbdW-His<sub>6</sub>

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdW) se empleó para la sobreproducción de la proteína MbdW-His<sub>6</sub>. Todos los cultivos se realizaron en medio LB con Km (50 µg/l) incubados en agitación a 37 °C. A partir de un preinóculo de células, se inocularon 100 ml de medio a una absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) de 0.05-0.10. Una vez el cultivo alcanzó una  $A_{600}$  de 0.5, se adicionó el inductor IPTG 0.5 mM. El cultivo se incubó 5 h y posteriormente se recogió por centrifugación. En los casos en los que no se realizó directamente la purificación, las células se conservaron a -20 °C.

Para la purificación se empleó el siguiente *buffer* de trabajo: Tris-HCl 20 mM, KCl 250 mM, glicerol 10%, imidazol (diferentes concentraciones), pH 7.9.

Las células se resuspendieron en 10 ml de *buffer* de trabajo complementado con imidazol 20 mM y a continuación se dividieron en alícuotas de 2 ml. Las células se rompieron por sonicación (5 rondas de pulsos cada 0.5 segundos a lo largo de 30 segundos, amplitud 70%; Bandelin Sonoplus). El extracto obtenido se centrifugó a 4 °C y 20000 g durante 20 min recuperándose el sobrenadante como la fracción de extracto celular.

La purificación de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> se realizó empleando una columna de afinidad que contenía níquel (HisTrap HP 1 ml *Ni Sepharose High Performance*; GE Healthcare) en un equipo ÄKTA (GE Healthcare). Una vez equilibrada la columna con el *buffer* de resuspensión, se hizo pasar el extracto celular a través de la misma. Para eluir la proteína MbdW-His<sub>6</sub> se utilizó un gradiente ascendente de concentración de imidazol (de 20 mM a 500 mM) durante 30 min. Se recogieron fracciones de 2 ml, de las cuales las que presentaban una mayor absorbancia a 280 nm se analizaron mediante geles de SDS-PAGE. Las fracciones que contenían proteínas del tamaño esperado se dializaron y concentraron empleando columnas de exclusión molecular Vivaspin 6 (membrana 10000 MCWO; Sartorius), de tal forma que al final del proceso la proteína purificada se

encontraba disuelta en *buffer* de trabajo con imidazol 20 mM. La proteína purificada se conservó a -20 °C, manteniendo su actividad a lo largo de varios meses.

### 5.2.2. Sobreproducción y purificación de MbdR-His<sub>6</sub>

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdR) se empleó para la sobreproducción de la proteína. La hiperproducción de la proteína se realizó en las mismas condiciones descritas para la purificación de MbdW-His<sub>6</sub> (ver apartado 5.2.1).

Para la purificación se empleó el siguiente *buffer* de trabajo: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, KCl 300 mM, imidazol (diferentes concentraciones), pH 8.

La preparación de los extractos celulares parte de la resuspensión de las células en 10 ml de *buffer* de trabajo con imidazol 20 mM. Las células se rompieron realizando dos pases sucesivos a través de una prensa de French (20000 psi; Aminco Corp.). El extracto obtenido se centrifugó a 4 °C y 20000 g durante 20 min, recuperándose el sobrenadante como la fracción de extracto celular.

Las columnas de afinidad empleadas para la purificación (Ni-NTA Spin Kit, Qiagen) se utilizaron según las instrucciones del fabricante. Las columnas se equilibran primero con el *buffer* de resuspensión de las células y mediante centrifugación se hacen pasar 5 ml de extracto celular. A continuación se realizan cuatro lavados con *buffer* de trabajo complementado con concentraciones crecientes de imidazol (20 mM, 75 mM y 100 mM).

La proteína se eluye con *buffer* de trabajo complementado con imidazol 250 mM, 500 mM y 1000 mM. En los casos en los que fue necesario, la proteína se dializó y concentró empleando columnas de exclusión molecular Vivaspin 500 (membrana 10000 MWCO; Sartorius). La proteína purificada se hace pasar a través de la columna y se lava cinco veces con *buffer* de trabajo complementado con imidazol 20 mM. La proteína se conservó a 4 °C durante más de seis meses sin pérdida de su actividad.

## 5.3. Cromatografía de filtración en gel

El cálculo de la masa molecular de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> nativa se realizó con 0.11 mg de proteína purificada. Para la cromatografía de filtración en gel se empleó una columna FPLC Superdex 200 HR 10/30 (10 mm de diámetro, volumen interior 24 ml; GE Healthcare) en un equipo ÄKTA (GE Healthcare). Como patrones de masa molecular se emplearon las siguientes moléculas: dextrano azul (2000 kDa, Sigma); apoferritina de

matrícula, moléculas  
bazo de caballo (443 kDa, Sigma); catalasa de hígado bovino (232 kDa; Sigma); albúmina sérica bovina, BSA (dos estados de asociación de 67 kDa y 134 kDa; Sigma); anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa; Serva); acetona (0.058 kDa). El *buffer* de desarrollo de la cromatografía es el *buffer* de trabajo descrito para la purificación de MbdW-His<sub>6</sub> sin imidazol.

Para el cálculo de la masa molecular nativa de MbdW-His<sub>6</sub> se emplearon 0.11 mg de proteína purificada.

## 6. Ensayos de actividad enzimática

---

### 6.1. Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa

Para los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se emplearon células tanto de *E. coli* como de *Azoarcus* sp. CIB portadoras de diferentes fusiones traduccionales con el gen testigo *lacZ*. Las células se cultivaron a 30 °C hasta alcanzar la densidad óptica deseada en cada caso (mitad de la fase exponencial de crecimiento). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se analizó permeabilizando las células, y las unidades de actividad enzimática (Unidades Miller) se determinaron según el método descrito por Miller (1972).

### 6.2. Ensayos de actividad CoA ligasa

Las actividades CoA ligasa se ensayaron en extractos de *E. coli* DH10B (pUCmbdA) y *E. coli* DH10B (pUCBZDA) en los que las enzimas MbdA y BzdA, respectivamente, estaban sobreproducidas. Los cultivos se realizaron en medio LB (50 ml) complementado con Ap y 3MBz (0.5 mM) a partir de una colonia única, y se incubaron 12 h a 20 °C en agitación suave. Una vez el cultivo adquiere una densidad óptica a 600 nm de ~0.15-0.20 las bacterias se recogen por centrifugación y se resuspenden en 600  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.5 al que se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets Complete Mini EDTA-free*, Roche) según las especificaciones del fabricante. Las células se lisaron por sonicación (3 pulsos de 10 segundos en un sonicador Branson) y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Los sobrenadantes fueron utilizados como extractos crudos en los ensayos de actividad CoA ligasa. La concentración de proteína total en los extractos se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA



como patrón. La actividad CoA ligasa fue monitorizada espectrofotométricamente a 30 °C mediante dos tipos de ensayo: directo y acoplado.

### 6.2.1. Ensayo directo

En el ensayo directo se determinó la actividad CoA ligasa mediante la monitorización espectrofotométrica de la formación de derivados de CoA (Niemetz *et al.* 1995). La mezcla estándar de ensayo (600  $\mu$ l) contenía Tris-HCl 100 mM pH 8.5, DTT 2 mM,  $MgCl_2$  5 mM, ATP 1 mM, CoA 0.4 mM, sustrato aromático 1 mM y un volumen variable de extracto crudo celular. La formación del benzoil-CoA se siguió espectrofotométricamente a 290 nm ( $\epsilon = 3.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Niemetz *et al.*, 1995). Al inicio de esta tesis se desconocía el coeficiente de extinción molar del 3-metilbenzoil-CoA, que se calculó experimentalmente para una longitud de onda de 290 nm a partir del compuesto sintetizado y purificado en el laboratorio del Prof. Matthias Boll (Universidad de Leipzig, Alemania), y resultó tener un valor de  $3.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 6.2.2. Ensayo indirecto (acoplado)

En el ensayo indirecto (acoplado) se determinó la actividad CoA ligasa midiendo la formación de AMP mediante su acoplamiento al sistema enzimático formado por la mioquinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, y la consecuente monitorización espectrofotométrica de la desaparición de NADH a 365 nm (Ziegler *et al.*, 1989). La catálisis de las enzimas con actividad CoA ligasa de ácidos aromáticos genera como uno de los productos de la reacción AMP, que es fosforilado con ATP por la mioquinasa para dar lugar a dos moléculas de ADP. El ADP es utilizado por la piruvato quinasa para fosforilar el fosfoenolpiruvato y dar lugar a piruvato. Finalmente, la lactato deshidrogenasa transforma el piruvato en lactato consumiendo NADH, que es la señal que se monitoriza espectrofotométricamente.

La mezcla de reacción (600  $\mu$ l) contenía Tris-HCl 100 mM (pH 8.5),  $MgCl_2$  5 mM, ATP 2 mM, CoA 1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, sustrato aromático 0.5 mM, NADH 0.5 mM, 1.2  $\mu$ l de una mezcla de piruvato quinasa (1 U) y lactato deshidrogenasa (1 U) de músculo de ratón (Roche), 0.6  $\mu$ l de mioquinasa (0.6 U) de músculo de pollo (Sigma-Aldrich) y un volumen variable de extracto crudo celular.

### 6.3. Ensayos de actividad (3-metil)-benzoil-CoA reductasa

Los ensayos de actividad reductasa se realizaron en el laboratorio del Prof. Matthias Boll de la Universidad de Leipzig (Alemania).

Los ensayos de la actividad reductasa se realizaron según se describe en Boll y Fuchs (1995), y Boll y Fuchs (1998). Para el análisis de la actividad reductasa se realizaron cultivos anaeróbicos de *Azoarcus* sp. CIB, o sus cepas derivadas, en las fuentes de carbono correspondientes. Debido a la extrema sensibilidad de la actividad reductasa a la presencia de oxígeno, todo el proceso ha de realizarse en condiciones anaeróbicas. Inicialmente, se resuspende 1 g de células en 2 ml de *buffer* de ruptura (Trietanolamina 20 mM/KOH pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, ditionito 0.5 mM, glicerol 10 %), previamente burbujeadado con nitrógeno, y se añade 1-2 mg de DNasa I. Las células se rompieron mediante una prensa de French (20000 psi; Aminco Corp.) y el lisado celular resultante fue ultracentrifugado 1 h a 100000 g bajo condiciones anaeróbicas, como se describe en Brackmann y Fuchs (1993). El sobrenadante resultante es el extracto celular crudo que se empleó para los ensayos de la actividad reductasa.

La mezcla de reacción (200 µl) contiene *buffer* (MOPS 100 mM pH 7.3, MgCl<sub>2</sub> 15 mM) complementado con ATP 5 mM, 3-metilbenzoil-CoA o benzoil-CoA 0.2 mM, citrato de titanio (III) 7.5 mM y un volumen variable de extracto celular. El ATP y el derivado CoA son cosustratos en el proceso de reducción, mientras que el citrato de titanio (III) es un donador artificial de electrones que reemplaza *in vitro* la función de las ferredoxinas acopladas a las reductasas *in vivo*. Las reacciones se incuban a 30 °C y transcurren en anaerobiosis estricta. A lo largo de diferentes tiempos de reacción se retiraron muestras en las que las proteínas se precipitaron mediante la adición de metanol (50 µl metanol para 25 µl muestra) y centrifugación (13000 rpm, 4 °C, 10 min) en una minifuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se trasvasa a un nuevo tubo Eppendorf y se centrifuga una vez más en las mismas condiciones. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se analizó mediante HPLC. El análisis de los productos generados se llevó a cabo en un sistema HPLC Waters con una columna de fase reversa Eurospher 100-5 C18 empleando como solvente para las muestras acetonitrilo y como *buffer* de desarrollo (flujo 0.75 ml min<sup>-1</sup>) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, pH 6.7. Los picos cromatográficos debidos a los compuestos metilados derivados del 3-metilbenzoil-CoA se identificaron por comparación con los compuestos no metilados, ya que su espectro UV de 210-400 nm es el mismo y su tiempo de retención respecto al 3-

metilbenzoil-CoA es el mismo que el de los compuestos no metilados respecto al benzoil-CoA.

## 6.4. Ensayos de actividad (metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa

### 6.4.1. Ensayo mediante HPLC

Los ensayos de actividad (metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa se realizaron en las condiciones descritas en Peters *et al.* (2007). La reacción (500  $\mu$ l) contenía Tris-HCl 100 mM pH 7.5, sustrato 0.5 mM y un volumen variable de proteína MbdW-His<sub>6</sub> purificada. Los sustratos empleados fueron (metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (metil-dienoil-CoA), ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (dienoil-CoA) y, dado que la reacción es reversible, los productos hidratados (metil)-6-hidroxi-monoenoil-CoA (metil-6OH-monoenoil-CoA) y 6-hidroxi-monoenoil-CoA (6OH-monoenoil-CoA) también se emplearon como sustrato para monitorizar la reacción reversa. En el transcurso de la reacción se extrajeron muestras (50  $\mu$ l) para su análisis por HPLC. La proteína presente en las muestras se precipita con metanol y se elimina por centrifugación (13000 rpm, 4 °C, 10 min) en una minifuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se centrifuga una vez más en las mismas condiciones. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se analiza mediante HPLC con una columna de fase reversa Eurospher 100-5 C18 en las mismas condiciones que se detallan en el apartado 6.3.

El consumo del sustrato se siguió monitorizando la absorción de los ésteres de CoA a 260 nm, y analizando los perfiles UV/visible característicos tanto de sustratos como de productos (Laempe *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 1999) empleando un detector Waters (Waters *photodiode array detector* 996). Los sustratos y productos utilizados como patrón fueron gentileza de Christian Eberlein (Universidad de Leipzig, Alemania).

Como control positivo de los ensayos se monitorizó la conversión dienoil-CoA  $\rightarrow$  6OH-monoenoil-CoA mediada por la proteína BamR<sub>Syn</sub> purificada, gentileza de Johannes Kung (Universidad de Leipzig, Alemania).

### 6.4.2. Ensayo espectrofotométrico

El análisis espectrofotométrico de la actividad de MbdW-His<sub>6</sub> se realizó monitorizando la reacción reversa 6OH-monoenoil-CoA  $\rightarrow$  dienoil-CoA. Se siguió la

reacción reversa de deshidratación empleando el derivado monoenoil no metilado como sustrato debido a su mayor disponibilidad y facilidad de purificación. En este ensayo se mide el aumento de absorbancia a 320 nm ( $\epsilon = 1700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) debido a la formación del dienoil-CoA (Laempe *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2007). Las condiciones de la reacción empleadas fueron las mismas que las descritas para el análisis de la actividad (metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa mediante HPLC (apartado 6.4.1).

## 7. Ensayos de unión de proteína a DNA

---

### 7.1. Marcaje de las sondas radiactivas

Las sondas se amplificaron a partir de DNA genómico de *Ascoarcus* sp. CIB mediante PCR empleando DNA polimerasa *Pfu* (Biotools B. M. Labs) y los siguientes pares de oligonucleótidos específicos (Tabla 5):

- Sonda  $P_O$  (271 pb): Interno *Pdiv>O ScaI* 5'.2 / *Pdiv>O EcoRI* 3'.2
- Sonda  $P_{BI}$  (251 pb): Interno *Pdiv>B1 ScaI* 5'.2 / *Pdiv>B1 EcoRI* 3'
- Sonda  $P_{A}$  (225 pb): *PmbdA ScaI* 5' / *PmbdA EcoRI* 3'
- Sonda  $P_{R}$  (352 pb): *PmbdR ScaI* 5' / *PmbdR EcoRI* 3'

Los fragmentos de PCR se purificaron mediante el kit *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene) y se digirieron con las enzimas *ScaI* y *EcoRI*. Los productos obtenidos se marcaron radiactivamente en el extremo 3' generado por *EcoRI* utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (5 U/ $\mu$ l, Promega) y [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (6000 Ci/mmol, 20mCi/ml; Perkin-Elmer). Los fragmentos marcados se purificaron empleando el kit *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene).

### 7.2. Ensayos de retardo en gel

Para los ensayos de retardo en gel se utilizaron las sondas radiactivas obtenidas tal y como se detalla en el apartado anterior. Las mezclas de reacción contenían la proteína purificada MbdR-His<sub>6</sub> a diversas concentraciones, así como la sonda correspondiente marcada radiactivamente a una concentración de 0.5 nM en un volumen final de reacción de 9  $\mu$ l. El tampón de retardo utilizado contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, glicerol 10%, KCl 50 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM, BSA 250  $\mu$ g/ml y DNA inespecífico de esperma de salmón a una concentración de 50  $\mu$ g/ml. El resultado de la reacción se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % con tampón TBE

0.5x (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). El gel se secó sobre papel Whatman 3MM y los productos de la reacción se detectaron por autorradiografía con películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont). La intensidad de las bandas se densitómetró empleando el programa Quantity One (BioRad).

### 7.3. Ensayos de protección frente a digestión con DNasa I (*footprinting*)

Las mezclas de reacción para el ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I se realizaron en tampón FP (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, KCl 50 mM, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM), al que se añadió BSA (500  $\mu$ g/ml) en presencia de la sonda correspondiente ( $P_O$ ,  $P_{BI}$ ,  $P_{-1}$ ,  $P_{3R}$ ) a una concentración de 2 nM y 10  $\mu$ l de MbdR-His<sub>6</sub> a diversas concentraciones. Las muestras (en un volumen final de reacción de 15  $\mu$ l) se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min, transcurridos los cuales se añadieron 3  $\mu$ l (0.05 U) de DNasa I (*FPLC pure* Roche) diluida en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y KCl 125 mM. La digestión con DNasa I se realizó a 37 °C durante 25 segundos y se detuvo por la adición de 180  $\mu$ l de solución DNasa STOP (acetato sódico 0.4 M, EDTA 2.5 mM, DNA de espermatozoos de salmón 50  $\mu$ g/ml y glicógeno 0.3  $\mu$ l/ml). Las muestras se sometieron a una extracción proteica con fenol y el DNA fue precipitado con 3 volúmenes de etanol absoluto (tras una incubación de al menos 1 h a -80 °C) mediante centrifugación a 14000 rpm y 4 °C en una minifuga refrigerada. Las muestras se lavaron con etanol al 70% y, posteriormente, se secaron y se resuspendieron en tampón de carga (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, formamida 80%, EDTA 20%, azul de bromofenol 0.05% m/v y azul de xilencianol 0.05% m/v). Finalmente, las muestras fueron desnaturalizadas por incubación a 95 °C durante 3 min.

En paralelo a las reacciones de *footprinting*, las correspondientes sondas se secuenciaron mediante el método A+G de Maxam y Gilbert (1980) y se analizaron junto a las reacciones de protección frente a la digestión con DNasa I en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% - urea 8 M, los cuales se secaron al vacío sobre papel Whatman 3 MM y, por último, se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

## 7.4. Ensayos de transcripción *in vitro*

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNasa dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) y se filtraron previamente a su uso. El *buffer* utilizado para la reacción contenía Tris-HCl 40 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y KCl 100 mM. El DNA molde utilizado correspondía a los plásmidos pJCDP<sub>O</sub> y pJCDP<sub>BI</sub> (Tabla 4). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50 µl, que contenían DNA plasmídico 0.25 nM y BSA a 500 µg/ml. Se añadió RNA polimerasa holoenzima de *E. coli* (1 U/µl, USB) a una concentración final de 30 nM y, a continuación, se añadió la proteína MbdR-His<sub>6</sub> diluida previamente en el tampón anteriormente mencionado que contenía además DTT 2 mM y BSA a 500 µg/ml, a diferentes concentraciones. Además, se añadieron en diversas ocasiones diferentes inductores (3-metilenzoil-CoA, benzil-CoA, feniacetil-CoA, CoA, 3MBz) a las concentraciones descritas en cada ensayo. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min. La elongación de la cadena de RNA naciente comenzó al añadir 5 µl de una mezcla que contenía ATP (1 mM), CTP (1 mM), GTP (1 mM), UTP (0.2 mM) y 1 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml; Hartmann Analytic). Se paró la reacción al cabo de 15 min con 50 µl de una solución STOP que contenía NaCl 350 mM, EDTA 50 mM y RNA de transferencia (salmón) 100 µg/ml. El mRNA fue precipitado con 3 volúmenes de etanol absoluto durante al menos 1 h a -30 °C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas en una minifuga refrigerada a 14000 rpm a 4 °C. Las muestras se secaron y se resuspendieron en 25 µl de tampón de carga (formamida 80% v/v, EDTA 20 mM, azul de bromofenol y azul de xilencianol), antes de ser calentadas a 90 °C y cargadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 4% - urea 8 M. La electroforesis se desarrolló a 300 V. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) con pantallas amplificadoras (Cronex Lightning Plus DuPont).

## 8. Ensayos de ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (Beckman) equipada con un espectrofotómetro UV-visible y con un rotor An50Ti con celdas de doble sector de cuarzo. Para la detección de la proteína, las medidas fueron llevadas a cabo utilizando una longitud de onda de absorción de 280 nm. En los diversos ensayos se utilizaron diferentes concentraciones de proteína MbdR-His<sub>6</sub> que variaban entre 11 y

46  $\mu\text{M}$ . En todos los casos, la proteína se encontraba disuelta en un tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, KCl 300 mM, imidazol 20 mM pH 8.0. La velocidad a la que se sometieron las muestras (400  $\mu\text{l}$ ) fue de 48000 rpm. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck y Rossmanith, 2000; Schuck *et al.*, 2002). Los coeficientes de sedimentación fueron corregidos por la composición del tampón utilizando el programa SEDNTERP (Laue, 1992) para obtener los valores estándares correspondientes (en agua y a 20 °C). La masa molecular aparente de MbdR-His<sub>6</sub> en solución se determinó mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que describe la distribución de concentraciones radiales de un soluto ideal. El volumen específico parcial de MbdR-His<sub>6</sub> se calculó a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína usando el programa de acceso público SEDNTERP (Laue, 1992).

## 9. Recursos informáticos

---

### 9.1. Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó con los siguientes programas y servidores: Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd.), análisis cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Bioedit *Sequence Alignment Editor* v7.0.3 (Hall, 1999), análisis de cromatogramas procedentes de reacciones rutinarias de secuenciación; Biosupport (<http://bioinfo.hku.hk/>), obtención de secuencias reversas y complementarias de DNA, traducción de secuencias de DNA a proteína; Institut Pasteur (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#welcome>), traducción de secuencias de DNA en los seis marcos de lectura simultáneamente; Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>), traducción de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos se compararon con las existentes en las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BlastN y BlastP, respectivamente (Altschul *et al.*, 1990). El servidor seleccionado para ejecutar estos algoritmos fue el del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/BLAST.cgi>).

La comparación de parejas de secuencias proteicas se realizó con el programa Blast2sequences a través del servidor del NCBI, mientras que para los alineamientos múltiples de secuencias se empleó el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) mediante el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Las propiedades teóricas de los productos proteicos se determinaron con la aplicación *ProtParam tool* (ExPASy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics) a través del servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>.

El *Codon Adaptation Index* (CAI; Sharp y Li, 1987) de algunos genes (*mbd*, *bss-bbs*) se calculó empleando la aplicación ECAI (*Expected CAI Calculation*; Puigbó *et al.*, 2008) a través del servidor <http://genomes.urv.es/CAIcal/E-CAI/> (Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Universidad Rovira i Virgili), utilizando la información de secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB disponible en nuestro grupo.

Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el programa Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc.)

## 9.2. Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de árboles filogenéticos se partió de alineamientos de múltiples secuencias aminoacídicas mediante el programa ClustalW, tal y como se indica en el apartado anterior. El alineamiento obtenido, mediante el “método del vecino más próximo” (*neighbour-joining*), se procesó con el programa PHYLIP (Phylogenetic Interface Package) versión 3.5.1. por J. Felsenstein (Brodskiĭ, 1995) a través del servidor TreeTop-GeneBee ([http://www.genebee.msu.su/services/phtree\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html)) del Instituto Belozersky de Biología Física-Química (Universidad Estatal de Moscú). El árbol obtenido se visualizó con el programa TreeView X 0.5.1 (Universidad de Glasgow).

## 9.3. Modelado de la estructura tridimensional de proteínas

Los modelos tridimensionales de proteínas se generaron con las aplicaciones web 3D-Jigsaw (Cancer Research UK, <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>) y SwissModel ([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling\\_simple1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1)).

La visualización de los modelos 3D se realizó con el programa PyMol (DeLano Scientific, <http://pymol.sourceforge.net/>).

Para la predicción de la estructura secundaria de las proteínas se empleó el programa PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, UCL Department of Computer Science).

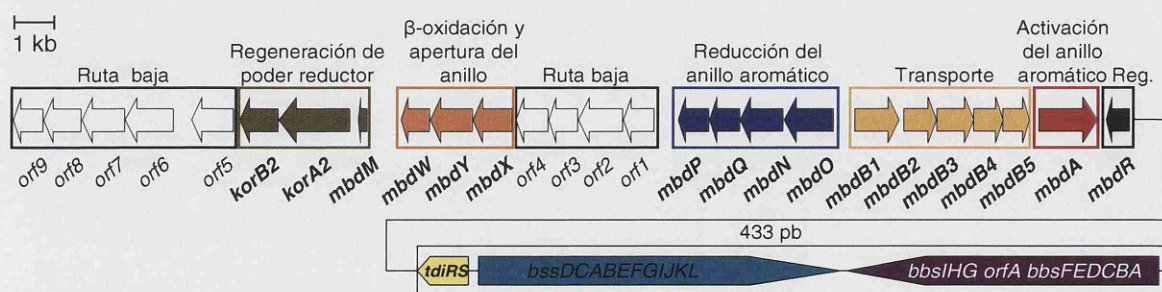


## **IV. RESULTADOS**



# 1. Identificación del *cluster* génico responsable de la ruta central para el catabolismo anaeróbico de 3-metilbenzoato en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha indicado en la *Introducción*, el *cluster* *bbs-bss* de *Azoarcus* sp. CIB es responsable de la ruta periférica de degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno (Fig. 9) (Blázquez, 2009). Si bien la ruta periférica *bbs-bss* transforma el tolueno en el metabolito central benzoil-CoA, la degradación anaeróbica del *m*-xileno a través de la ruta *bss-bbs* genera 3-metilbenzoil-CoA como metabolito (Krieger *et al.*; 1999; Achong *et al.*, 2001). La degradación anaeróbica de este metabolito central, el 3-metilbenzoil-CoA, no se había descrito en la literatura científica con anterioridad a la realización de esta Tesis Doctoral. La secuenciación del genoma de *Azoarcus* sp. CIB permitió analizar las inmediaciones del *cluster* *bss-bbs*, por lo que se pudo detectar la presencia de una agrupación génica que podría codificar una nueva ruta central para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos, ya que muchos de estos genes presentan una notable identidad de secuencia con los de la ruta central del benzoil-CoA en la cepa CIB y en otros microorganismos anaerobios facultativos (Tabla 6) (Gibson y Gibson, 1992; Breese *et al.*, 1998; López-Barragán *et al.*, 2004). El nuevo *cluster* de genes se postuló implicado en una nueva ruta central para la degradación de 3-metilbenzoil-CoA y su precursor 3MBz. Por analogía con el *cluster* *bzd* (acrónimo de *benzoate degradation*) la nueva agrupación génica se denominó *cluster* *mbd* (*methylbenzoate degradation*). En la Figura 10 se puede observar un esquema de la disposición de los genes del *cluster* *mbd* y, junto a él, el *cluster* *bss-bbs* necesario para la degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno a benzoil-CoA y 3-metilbenzoil-CoA, respectivamente.



**Figura 10. Esquema modular del *cluster* *mbd*.** Representación del *cluster* *mbd* propuesto para la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA, necesaria para la degradación anaeróbica de 3MBz y *m*-xileno. El *cluster* se ha dividido en módulos funcionales propuestos para las diferentes etapas bioquímicas de la ruta central o para otras actividades necesarias para la degradación, como el transporte y la regulación (Reg.). Adyacente al *cluster* *mbd* se encuentra el *cluster* *bss-bbs* que codifica la ruta periférica de degradación anaeróbica del tolueno y el *m*-xileno. Dicho *cluster* se esquematiza con tres flechas alargadas que representan los operones *tdiRS* (regulador; flecha amarilla), *bss* (catabólico; flecha azul claro) y *bbs* (catabólico; flecha morada).

Gen	D (pb)	Producto génico aa/kDa	Función hipotética del producto génico	Productos génicos relacionados		
				Nombre/aa	Función	Referencia
<i>orf2</i>	35	263/28.4	Enoil-CoA hidratasa	BH1160DRAFT_2879 / 285	Posible enoil CoA hidratasa/isomerasa	IE:AV1841
<i>orf8</i>	12	336/36.1	Acil-CoA deshidrogenasa	Bcep18194_47126 / 328	Posible acil CoA deshidrogenasa	ABR06170
<i>orf7</i>	0	383/42.0	Acil-CoA deshidrogenasa	Bper3290 / 383	Posible acil CoA deshidrogenasa	CAP43632
<i>orf6</i>	481	437/46.3	Acetil-CoA hidrolasa	BH1160DRAFT_2876 / 422	Posible acetil CoA hidrolasa/transferasa relacionada con GCN5	IE:AV1838
<i>orf5</i>	158	378/41.0	Metil-glutaril-CoA deshidrogenasa (CcdII)	MGR_2405 / 380	Posible butiril CoA deshidrogenasa	C:AM75442
<i>korB2</i>	40	341/37.0	Subunidades $\alpha$ -cetoglutaratato oxidoreductasa	KorB2 / 341	Posible $\alpha$ -cetoglutaratato ferredoxina oxidoreductasa subunidad $\beta$	Q51471
<i>korA2</i>	202	635/68.1	Reduc-tasa	KorA2 / 636	Posible $\alpha$ -cetoglutaratato ferredoxina oxidoreductasa subunidad $\alpha$	Q51472
<i>mbdM</i>	634	80/8.5	Ferredoxina	Fdx / 81	Ferredoxina con dos núcleos [4Fe-4S]	C:AAV5141
<i>mbdN</i>	13	256/27.7	Dienoal-CoA hidratasa	Dch / 258	Ciclohexa-1,5-dieno-carbonil CoA hidratasa	CAA12246
<i>mbdY</i>	24	378/40.9	Oxoacil-CoA hidrolasa	Oah / 377	6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil CoA hidrolasa	CAA12245
<i>mbdX</i>	85	355/38.1	1-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	Had / 368	6-hidroxi-ciclohex-1-eno-1-carbonil CoA deshidrogenasa	CAA12244
<i>orf1</i>	12	287/31.6	1-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	Hbd3 / 289	Posible 3-hidroxi-butiril CoA deshidrogenasa	ABR14715
<i>orf3</i>	10	256/27.7	Enoil-CoA hidratasa	Crt1 / 257	Posible enoil CoA hidratasa	C:AY33939
<i>orf2</i>	13	398/41.7	Tiolasa	BH1160DRAFT_2875 / 398	Posible tiolasa	IE:AV1837
<i>orf1</i>	621	280/32.1	Desconocida	Hfur_4417 / 286	Posible amido-hidrolasa 2	ADB63228
<i>mbdP</i>	3	273/29.5	Subunidades 3-metilbenzoil-CoA reductasa	BerD / 282	Benzoil-CoA reductasa subunidad $\delta$	Q87877
<i>mbdQ</i>	21	269/28.4	metilbenzoil-CoA reductasa	BadI / 437	Benzoil-CoA reductasa subunidad $\alpha$	AAC23927
<i>mbdN</i>	20	388/44.1	reductasa	BerC / 386	Benzoil-CoA reductasa subunidad $\gamma$	CAA12247
<i>mbdO</i>	543	445/49.9		BadI / 436	Benzoil-CoA reductasa subunidad $\beta$	AAC23926
<i>mbdI</i>	104	397/42.4	Subunidades de transportador ABC	ebA5303 / 395	Posible subunidad periplásmica del transportador de benzoato	Q5PUM6
<i>mbdB2</i>	1	290/31.3	Subunidades de transportador ABC	ebA5304 / 288	Posible permeasa del transportador de benzoato	Q5PUM5
<i>mbdB3</i>	0	329/35.8		azo3048 / 326	Posible permeasa del transportador de benzoato	C:AI25665
<i>mbdB4</i>	0	259/27.4		ebA5307 / 253	Posible ATPasa del transportador de benzoato	Q5PUM3
<i>mbdB5</i>	231	238/25.9		ebA5309 / 238	Posible ATPasa del transportador de benzoato	Q5PUM2
<i>mbdA</i>	214	526/57.9	3-metilbenzoato CoA ligasa	BzdA / 533	Benzoato-CoA ligasa	AAQ08820
<i>mbdR</i>	-	214/23.8	Regulador transcripcional	AcrR / 215	Regulador transcripcional (familia TetR)	CAQ30937

**Tabla 6. Análisis de los genes *mbd* y de sus productos génicos.** En la tabla se detallan los nombres de los genes del *cluster mbd*, la distancia (D) que separa cada gen del siguiente expresada en pares de bases (pb), la longitud en aminoácidos (aa) de los productos génicos y su masa molecular (en kDa), así como la hipotética función que se les ha asignado a cada uno de ellos. También se especifica la longitud en aminoácidos de los productos génicos que muestran similitud significativa con los productos de los genes *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB, así como su función (demostrada o predicha), el grado de identidad de secuencia que comparten con cada uno de ellos, el microorganismo al que pertenecen y su referencia en las bases de datos.

La significativa identidad de secuencia entre los productos génicos del *cluster mbd* y distintas proteínas implicadas en la degradación anaeróbica de benzoato en varios microorganismos ha permitido sugerir la función de un gran número de genes *mbd*, (Tabla 6), los cuáles se organizarían en los siguientes módulos funcionales (Fig. 10):

- **Activación del anillo aromático.** El producto del gen *mbdA* activaría al 3MBz mediante la adición de una molécula de CoA. Esta actividad 3MBz-CoA ligasa no sería necesaria para la degradación del *m*-xileno, puesto que la ruta periférica de este compuesto genera 3-metilbenzoil-CoA como producto final (Krieger *et al.*, 1999).
- **Reducción del anillo aromático.** Los genes *mbdONQP* codificarían la 3-metilbenzoil-CoA reductasa responsable de la reducción del anillo aromático del 3-metilbenzoil-CoA.
- **Regeneración del poder reductor de la 3-metilbenzoil-CoA reductasa.** Los genes *kor* codificarían una actividad  $\alpha$ -cetoglutarato óxido-reductasa (Dörner y Boll, 2002; Ebenau-Jehle *et al.*, 2003), relacionada con la transferencia de poder reductor desde un compuesto donador ( $\alpha$ -cetoglutarato) a la 3-metilbenzoil-CoA reductasa. Esta transferencia electrónica estaría mediada por la ferredoxina codificada por el gen *mbdM*.
- **Apertura del anillo.** Los genes *mbdXYZW* codificarían las actividades necesarias para actuar sobre el derivado dienol-CoA que se genera como resultado de la pérdida de la aromaticidad del anillo bencénico del 3-metilbenzoil-CoA. Tras una secuencia de reacciones de hidratación, deshidrogenación e hidrólisis similar a una  $\beta$ -oxidación se abre el anillo alicíclico dando lugar a un compuesto alifático (ácido graso dicarboxílico).
- **Transporte de 3MBz.** El transportador de tipo ABC codificado por *mbdB12345* estaría implicado en la entrada de 3MBz en la bacteria.
- **Regulación.** *mbdR* codificaría un regulador transcripcional específico de los genes *mbd*.
- **Ruta baja.** Las *orf1-9* muestran identidad de secuencia con genes que codifican actividades de tipo hidratasa, hidrolasa, deshidrogenasa o tiolasa que actúan sobre derivados CoA y que podrían estar relacionados con actividades necesarias para

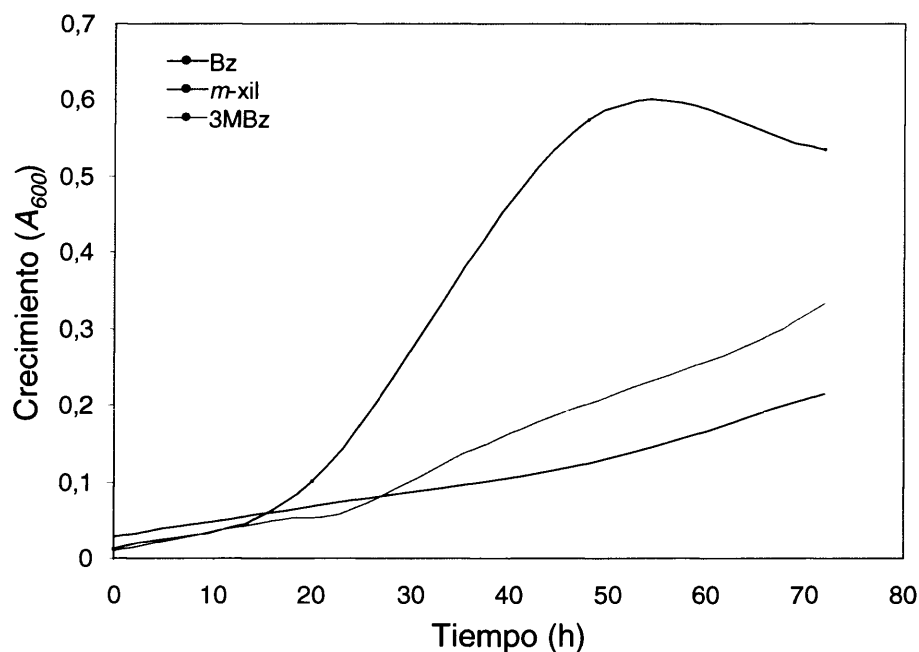
la ruta baja de degradación del ácido dicarboxílico que se genera en la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA.

Así pues, en una región del genoma de *Azoarcus* sp. CIB de aproximadamente 60 kb se encontrarían las rutas periférica y central necesarias para la transformación anaeróbica del *m*-xileno en intermediarios del metabolismo energético central de la bacteria.

## 2. Confirmación de la implicación del *cluster mbd* en la degradación de 3-metilbenzoato y *m*-xileno

### 2.1. Crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en 3-metilbenzoato

La identificación de un *cluster* génico que posiblemente codificaba las actividades enzimáticas necesarias para la degradación anaeróbica de 3MBz motivó que se confirmara el crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB usando este compuesto aromático como única fuente de carbono y energía.



**Figura 11. Crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB empleando benzoato, *m*-xileno y 3MBz como únicas fuentes de carbono.** Se valoró el incremento de absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) de *Azoarcus* sp. CIB cultivado anaeróbicamente a 30 °C, en medio mínimo MC con benzoato 3 mM (Bz; rojo), *m*-xileno 250 mM en fase orgánica (*m*-xil; azul) o 3-metilbenzoato 3 mM (3MBz; verde) como únicas fuentes de carbono.

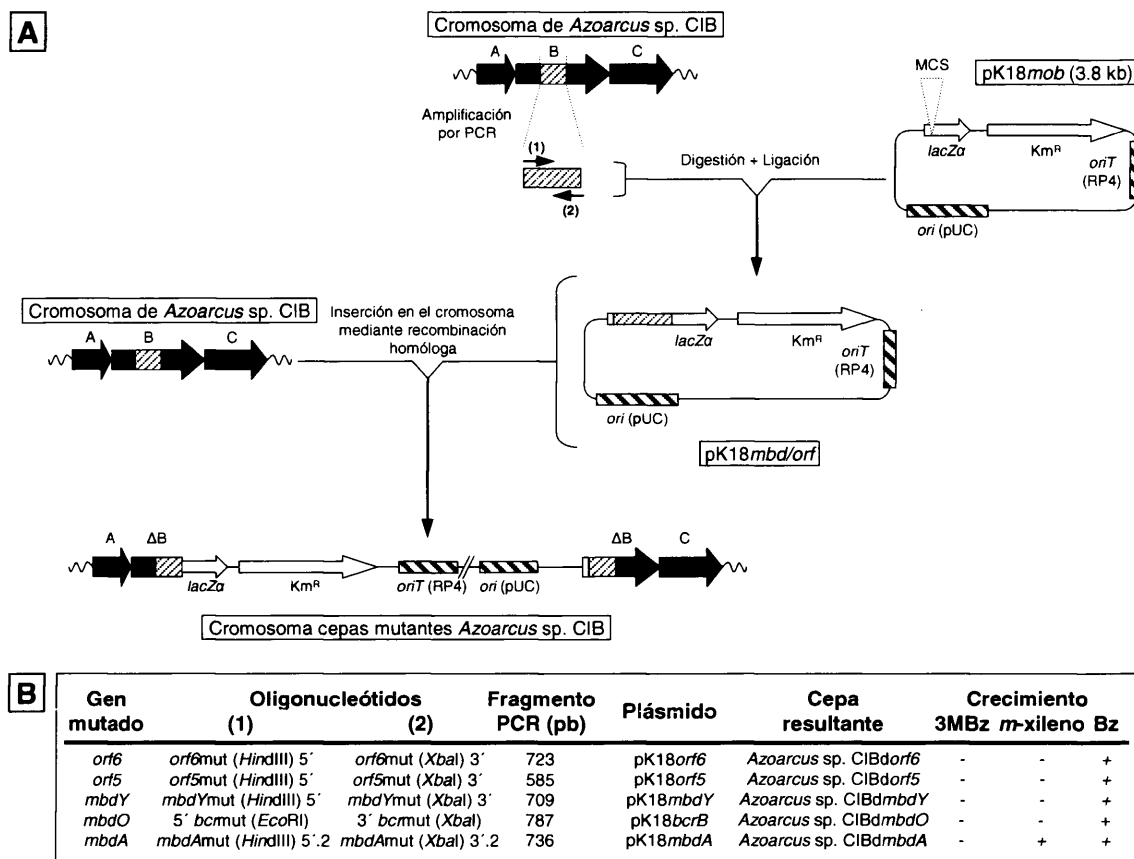
En la Figura 11 se puede observar una gráfica comparativa entre el crecimiento anaeróbico de la cepa *Azoarcus* sp. CIB en medio mínimo MC utilizando benzoato, *m*-xileno o 3MBz como únicas fuentes de carbono. El crecimiento anaeróbico de *Azoarcus* sp. CIB en 3MBz (3 mM) se ve favorecido cuando el inóculo procede de un cultivo previo en el que se emplea como fuente de carbono una mezcla de benzoato (0.5 mM) y 3MBz (2.5 mM). El crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB en benzoato alcanza una mayor densidad óptica ( $A_{600} \sim 0.5-0.6$ ) y es más rápido (tiempo de duplicación 6-8 h) (López-Barragán *et al.*, 2004a) que el detectado en 3MBz. El tiempo de duplicación de *Azoarcus* sp. CIB en 3MBz es de aproximadamente 24 h, al igual que sucede con cultivos similares que emplean *m*-xileno como fuente de carbono (Blázquez, 2009). A partir de las 72 h el cultivo comienza a entrar en fase estacionaria, y tras otras 72 h experimenta una significativa disminución en su densidad óptica (datos no mostrados).

## 2.2. Crecimiento anaeróbico de mutantes de *Azoarcus* sp. CIB en distintos genes del *cluster mbd* utilizando 3-metilbenzoato y *m*-xileno como fuentes de carbono

Para confirmar experimentalmente que el *cluster mbd* estaba implicado en el crecimiento de *Azoarcus* sp. CIB empleando 3MBz como única fuente de carbono, se procedió a la construcción de mutantes por inserción en algunos de los genes *mbd*. Los genes seleccionados fueron *mbdO*, *mbdY*, *mbdA*, *orf5* y *orf6*. Las cepas mutantes se construyeron mediante un proceso de mutagénesis por inserción como se indica en el apartado 4.3 de *Materiales y Métodos*. En la Figura 12 aparece detallado un esquema del proceso de mutación y las cepas mutantes generadas.

Las cepas mutantes *Azoarcus* sp. CIB~~*mbdO*~~, *Azoarcus* sp. CIB~~*mbdY*~~, *Azoarcus* sp. CIB~~*mbdA*~~, *Azoarcus* sp. CIB~~*orf5*~~ y *Azoarcus* sp. CIB~~*orf6*~~ se mostraron incapaces de crecer anaeróticamente en medio mínimo MC utilizando 3MBz como única fuente de carbono, lo que confirma su implicación en el catabolismo de este compuesto aromático. Además, todas estas cepas mutantes, excepto *Azoarcus* sp. CIB~~*mbdA*~~, se mostraban incapaces de crecer anaeróticamente empleando *m*-xileno como única fuente de carbono, lo que está de acuerdo con el papel propuesto para MbdA como una 3MBz-CoA ligasa encargada de la activación del 3MBz y, por tanto, no necesaria para la degradación del *m*-xileno, que genera 3-metilbenzoil-CoA como producto final de la ruta periférica bss-bbs. Como cabría esperar, todos los mutantes generados en el *cluster mbd* eran capaces de utilizar anaeróticamente benzoato como única fuente de carbono (Fig.

12B) y un mutante en la ruta *bzd*, *Azoarcus* sp. CIBdbzdN, era capaz de crecer en 3MBz (datos no mostrados). Estas evidencias indican que la ruta *mbd* es distinta e independiente de la ruta central *bzd*.



**Figura 12. Representación esquemática de la construcción de los mutantes por inserción en los genes del cluster *mbd* en *Azoarcus* sp. CIB.** **A)** Mediante PCR a partir de DNA genómico se amplificaron fragmentos internos de algunos genes del cluster *mbd*; el nombre de los genes mutados y el de los oligonucleótidos empleados (su secuencia se detalla en la Tabla 5) para la amplificación de los fragmentos internos se muestran en la tabla del panel B). Los fragmentos resultantes se clonaron en el vector suicida pK18*mob* (Tabla 4) no replicativo en *Azoarcus* sp. CIB, previa digestión mediante las enzimas de restricción indicadas en cada caso. Los plásmidos pK18*mbd/orf* fueron transferidos a *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental empleando como cepa donadora *E. coli* S17-1λ*pir*, tal y como se indica en el apartado 4.3 de *Materiales y Métodos*. La recombinación homóloga subsiguiente origina la disrupción de los genes correspondientes y las cepas mutantes mostradas en el panel B). Las abreviaturas indicadas en el esquema son: *lacZα* (fragmento que codifica la subunidad α de la β-galactosidasa), *Km<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a la kanamicina), *oriT* (origen de transferencia conjugativa del replicón RP4), *ori* (origen de replicación *colE1* de los plásmidos de la familia pUC) y MCS (*Multiple Cloning Site* del plásmido pK18*mob*); Δ indica gen truncado. **B)** Tabla resumen de los genes mutados, los oligonucleótidos empleados para la amplificación del fragmento interno del gen mutado, su tamaño y el plásmido en el que se clonó. Además, se indica el nombre de la cepa obtenida y su capacidad para crecer anaeróbicamente en medio mínimo MC con 3MBz, *m*-xileno o benzoato (Bz) como fuente de carbono (-, indica ausencia de crecimiento; +, indica crecimiento).



### 3. Caracterización bioquímica de algunas actividades enzimáticas clave de la ruta mbd

Como se ha indicado en el apartado 1.2.2.1 de la *Introducción*, tres de los pasos clave en las rutas centrales de degradación anaeróbica de ácidos aromáticos son: a) la activación del compuesto mediante la adición de una molécula de CoA; b) la subsiguiente reducción del anillo aromático mediante una reductasa multicomponente; c) el procesamiento y la apertura del anillo mediante una serie de reacciones similares a las de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.

Los resultados de la comparación de secuencia del *cluster mbd* (Tabla 6) muestran que los genes candidatos para codificar los productos proteicos responsables de estas actividades enzimáticas serían: *mbdA* (posible 3MBz-CoA ligasa), *mbdONQP* (posible 3-metilbenzoil-CoA reductasa) y *mbdXYW* (posible sistema de  $\beta$ -oxidación modificado). Para tratar de confirmar y caracterizar estas actividades enzimáticas se procedió a su estudio bioquímico.

#### 3.1. Análisis de la actividad 3-metilbenzoato-CoA ligasa

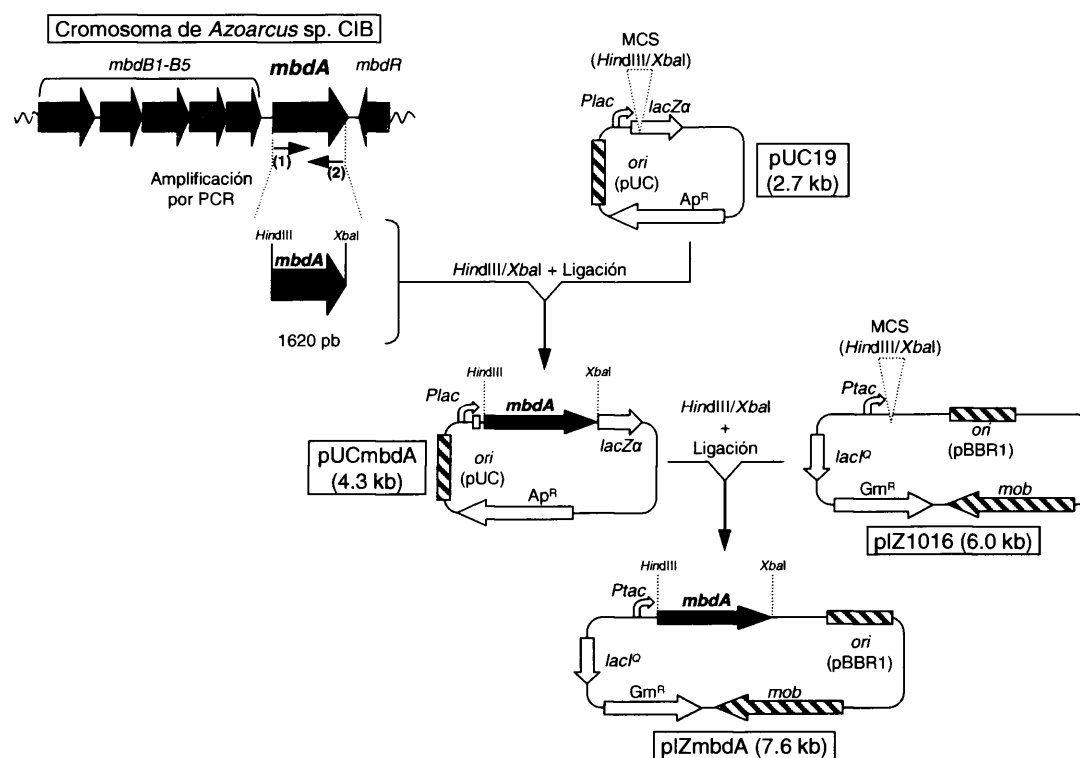
##### 3.1.1. Estudio y clonación del gen *mbdA*

El análisis de la secuencia aminoacídica del producto del gen *mbdA* señaló su similitud con proteínas CoA ligasas de compuestos aromáticos (Tabla 6). La proteína MbdA presenta un tamaño (526 aa, 57.9 kDa) y pI (5.9) similar al de las benzoato, 3-hidroxibenzoato, 4-hidroxibenzoato y 2-aminobenzoato CoA ligasas que han sido descritas en diferentes microorganismos (Tabla 1). Además, en todas estas proteínas se identifican dominios de unión a AMP (Pfam00501), una característica típica de esta familia de CoA ligasas. La similitud del producto del gen *mbdA* con miembros conocidos de la familia de las CoA ligasas de compuestos aromáticos, sugería su posible función como una 3MBz-CoA ligasa.

Por otro lado, tal y como aparece reflejado en el apartado 2.2 de *Resultados*, la cepa *Azqarcus* sp. CIBd*mbdA* es incapaz de crecer anaeróbicamente en 3MBz como única fuente de carbono, pero sí es capaz de crecer empleando *m*-xileno (Fig. 12B). Este resultado también sugería que el producto del gen *mbdA* era el responsable de la actividad 3MBz-CoA ligasa, puesto que esta actividad sería la única del *cluster mbd*

prescindible para la degradación del *m*-xileno, ya que en su catabolismo periférico se forma directamente 3-metilbenzoil-CoA (Krieger *et al.*, 1999) (Fig. 9).

Para confirmar que el gen *mbdA* codifica la 3MBz-CoA ligasa se procedió inicialmente a su clonación. El gen *mbdA* se amplificó mediante PCR y posteriormente se clonó bajo el control del promotor *Plac* en el vector de expresión pUC19, dando lugar al plásmido pUCmbdA (Tabla 4, Fig. 13). Dado que pUCmbdA no es capaz de replicar en *Azoarcus* sp. CIB, el gen *mbdA* se subclonó en el vector de amplio rango de hospedador pIZ1016 bajo el control del promotor *Ptac*, de forma que se generó la construcción pIZmbdA (Fig. 13). Cuando el plásmido pIZmbdA se introdujo en la cepa *Azoarcus* sp. CIBd*mbdA* mediante electroporación, la cepa resultante, *Azoarcus* sp. CIBd*mbdA* (pIZmbdA), recuperó la capacidad de crecimiento anaeróbico en medio mínimo empleando 3MBz como fuente de carbono, lo que indicaba que el gen *mbdA* clonado se expresaba, era funcional y podía ser utilizado para confirmar su actividad 3MBz-CoA ligasa.



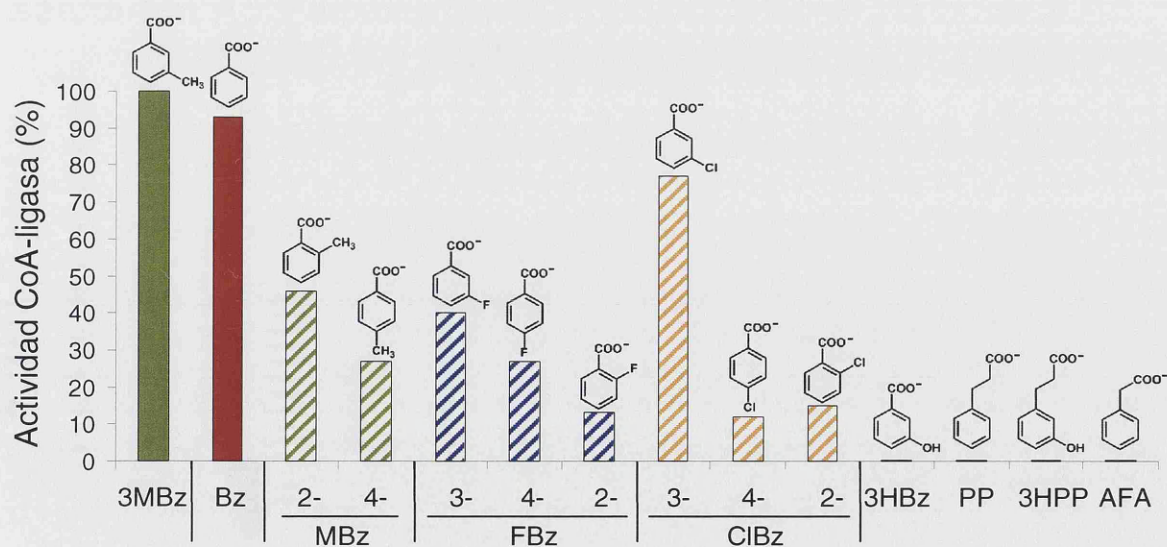
**Figura 13. Representación esquemática de la clonación del gen *mbdA* en los vectores de expresión pUC19 y pIZ1016.** El gen *mbdA* se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico, empleando la pareja de oligonucleótidos: (1) *mbdA* *Hind*III 5' y (2) *mbdA* *Xba*I 3' (Tabla 5). Las abreviaturas indicadas en el esquema son : *lacZα* (fragmento que codifica la subunidad α de la β-galactosidasa), *Ap<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a la ampicilina), *Gm<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a la gentamicina), *ori* (origen de replicación), **MCS** (*Multiple Cloning Site* de los diferentes plásmidos), *mob* (región para la movilización), *lac<sup>R</sup>* (gen que codifica el represor LacI del operón *lac*), *Plac* y *Ptac* (promotores *lac* y *tac*). Se indican también las enzimas de restricción utilizadas.

### 3.1.2. El gen *mbdA* codifica una 3-metilbenzoato-CoA ligasa

Para determinar si el gen *mbdA* codificaba una 3MBz-CoA ligasa se realizaron ensayos con la fracción soluble de extractos celulares de *E. coli* DH10B (pUCmbdA) siguiendo el protocolo que aparece reseñado en el apartado 6.2 de *Materiales y Métodos*.

Los extractos celulares procedentes de *E. coli* DH10B (pUCmbdA) mostraron una actividad 3MBz-CoA ligasa significativa tanto utilizando el ensayo de actividad directo ( $0.31 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) como el acoplado ( $0.11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ), y que no se detectó con un extracto control procedente de células de *E. coli* DH10B (pUC19). Para la realización de los ensayos directos se calculó experimentalmente el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del 3-metilbenzoil-CoA, que resultó tener el mismo valor que el del benzoil-CoA ( $3.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Estos resultados confirmaron que el gen *mbdA* se expresa en *E. coli* y que su producto es la 3MBz-CoA ligasa, responsable de la activación del 3MBz a 3-metilbenzoil-CoA.

Con el objetivo de determinar sobre qué compuestos aromáticos puede ejercer su acción enzimática la proteína MbdA, se emplearon como sustrato diferentes moléculas de estructura similar al 3MBz. En la Figura 14 se muestra un resumen de los ensayos de actividad CoA ligasa realizados. La máxima actividad CoA ligasa se logró cuando se



**Figura 14. Actividad CoA ligasa de la enzima MbdA empleando como sustrato diferentes compuestos aromáticos.** Valores de actividad CoA ligasa obtenidos utilizando el ensayo acoplado descrito en el apartado 6.2 de *Materiales y Métodos*. Los valores se representan como un porcentaje de la actividad máxima obtenida en 3MBz, que se corresponde con  $0.11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína. Los compuestos utilizados en el ensayo fueron: 3MBz; benzoato (Bz); 2 y 4 metilbenzoato (2-/4-MBz); 2, 3 y 4 fluorobenzoato (2-/3-/4-FBz); 2, 3 y 4 clorobenzoato (2-/3-/4-ClBz); 3-hidroxibenzoato (3HBz); fenilpropionato (PP); 3-hidroxifenilpropionato (3HPP); fenilacetato (AFA). Los valores representados son la media de tres experimentos independientes con una desviación estándar inferior al 10%.

empleó como sustrato 3MBz (100%). El derivado no metilado, benzoato, generó también un elevado nivel de actividad (93%). Por el contrario, el cambio en la posición del sustituyente metilo redujo en un 50% (2-metilbenzoato) y en un 70% (4-metilbenzoato), la actividad máxima. También se obtuvieron actividades destacables con diferentes derivados fluorados y clorados del benzoato, especialmente cuando el grupo funcional se encuentra en posición *meta* (40% para el 3-fluorobenzoato y 77% para el 3-clorobenzoato). En cambio, no se detectó actividad catalítica con otros compuestos análogos del benzoato, como el 3-hidroxibenzoato o los ácidos fenilpropiónico, 3-hidroxifenilpropiónico y fenilacético.

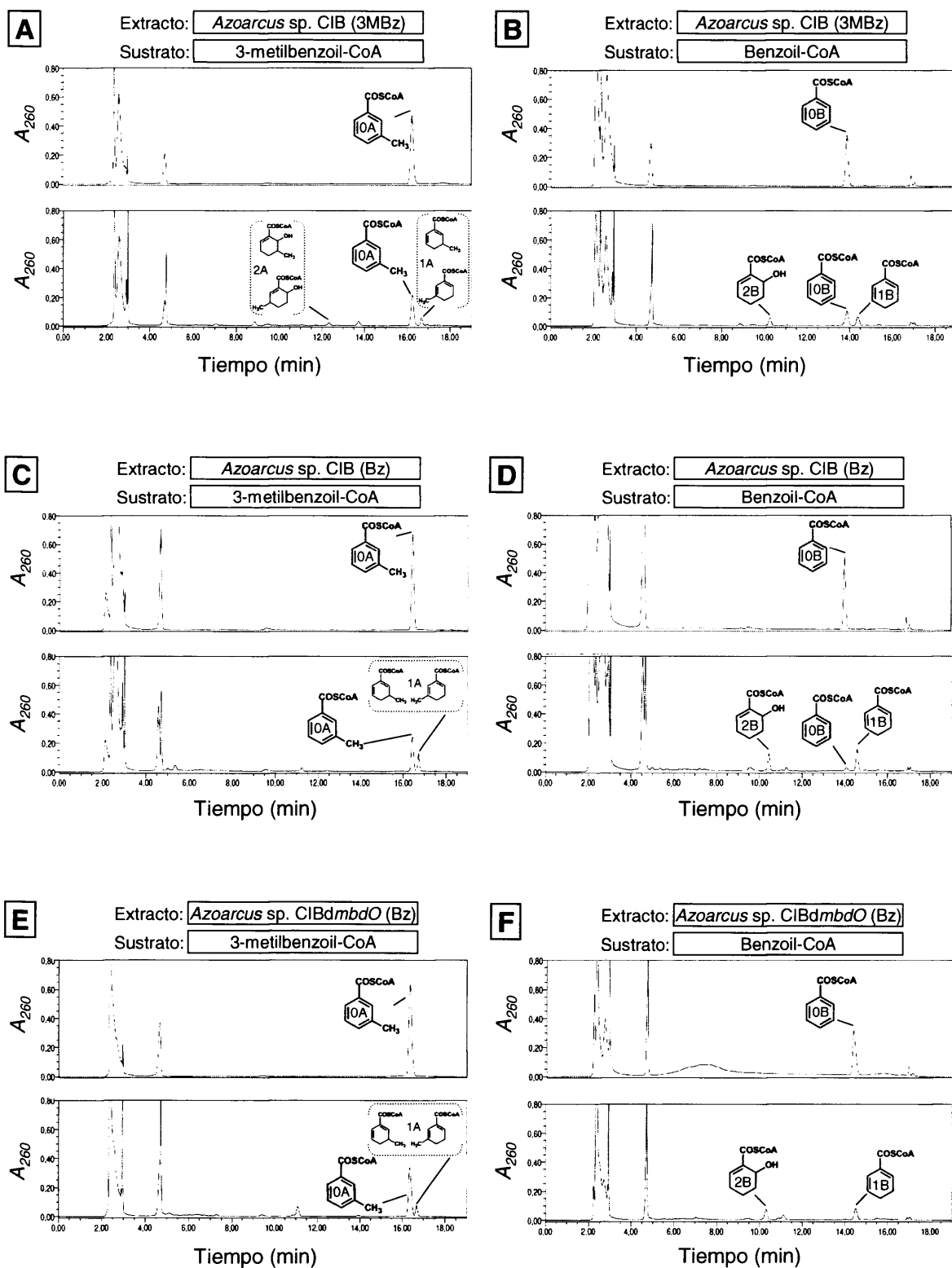
Los resultados obtenidos mostraron que la proteína MbdA era capaz de catalizar de forma óptima la adición de CoA tanto a una molécula de 3MBz como a una de benzoato, por lo que se trata de la segunda benzoato-CoA ligasa que se describe en *Azoarcus* sp. CIB. La proteína BzdA, codificante de la actividad benzoato-CoA ligasa previamente descrita en *Azoarcus* sp. CIB, es incapaz de catalizar la reacción CoA ligasa empleando 3MBz como sustrato (López-Barragán *et al.*, 2004a). Por lo tanto, MbdA y BzdA son isoenzimas capaces de activar benzoato a benzoil-CoA pero MbdA es la única de las dos proteínas que reconoce al 3MBz.

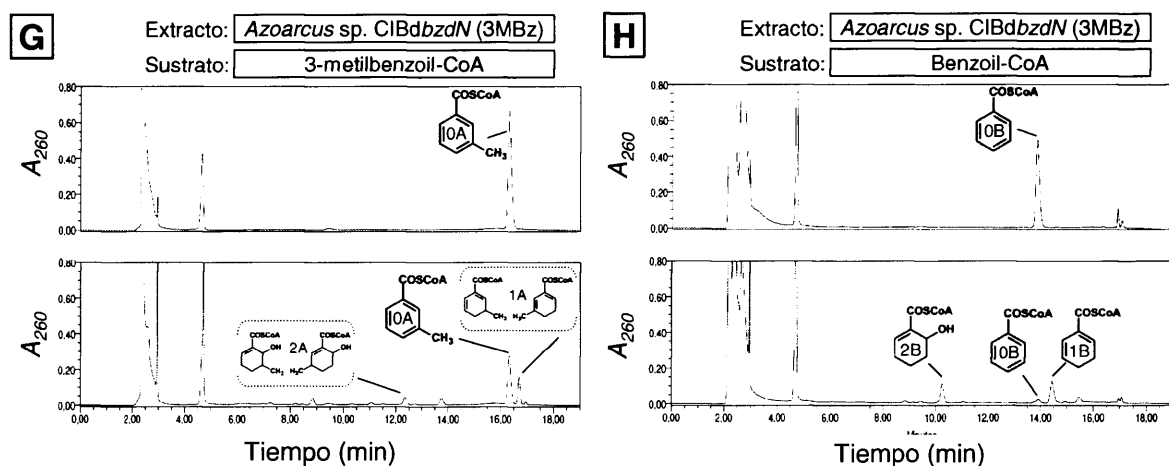
### **3.2. Análisis de la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa codificada por los genes *mbdONQP***

Como se ha indicado en el apartado 1.2 de la *Introducción*, el paso clave en la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos activados con CoA es la pérdida de aromaticidad del anillo bencénico a través de un proceso de reducción. La importancia que tiene esta actividad para la degradación de los compuestos aromáticos en ausencia de oxígeno convirtió en un objetivo prioritario la identificación de una posible actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa codificada en el *cluster mbd*. La significativa similitud de secuencia de los productos de los genes *mbdQ*, *mbdO*, *mbdN* y *mbdP* con las cuatro subunidades que conforman la benzoil-CoA reductasa de *T. aromatica* y *R. palustris* sugería que se trataba de las correspondientes subunidades de una posible 3-metilbenzoil-CoA reductasa.

Además, en el *cluster mbd* se han identificado los genes codificantes de una presunta ferredoxina (*mbdM*) y de un sistema  $\alpha$ -cetoglutarato:ferredoxina óxido-reductasa de dos componentes (*korA2B2*), que podrían ser los encargados de aportar el

poder reductor a la 3-metilbenzoyl-CoA reductasa. La existencia de todos los genes necesarios para la actividad 3-metilbenzoyl-CoA reductasa de la ruta mbd, motivó el estudio de dicha actividad.





**Figura 15** (comienza en la página anterior). **Análisis mediante HPLC de la conversión de 3-metilbenzoyl-CoA y benzoyl-CoA en extractos celulares de distintas cepas de *Azoarcus* sp. CIB.** Las cepas *Azoarcus* sp. CIB, *Azoarcus* sp. CIBdmbdO y *Azoarcus* sp. CIBdbzdN se cultivaron en presencia de 3MBz o benzoato (Bz). La obtención de los extractos celulares y el ensayo de la actividad reductasa se realizaron como se detalla en el apartado 6.3 de *Materiales y Métodos*. Se monitorizó la actividad de los extractos tras cinco minutos de incubación con los sustratos 3-metilbenzoyl-CoA (paneles A, C, E y G) y benzoyl-CoA (paneles B, D, F y H). Las gráficas representan el perfil de retención en HPLC de los derivados CoA generados mediante el seguimiento de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). En cada uno de los paneles, la mitad superior (rojo) representa el perfil de retención de la molécula usada como sustrato en el ensayo, mientras que la mitad inferior (negro) representa la desaparición de los sustratos y la generación de los productos tras la adición de los extractos. Los paneles A, B, C y D muestran los ensayos realizados con extractos de *Azoarcus* sp. CIB. Los paneles E y F muestran los ensayos realizados con *Azoarcus* sp. CIBdmbdO. Los paneles G y H se corresponden con los ensayos realizados con *Azoarcus* sp. CIBdbzdN. En el interior de las gráficas los picos del cromatograma correspondientes con los diferentes compuestos se indican con el siguiente código: 0A, 3-metilbenzoyl-CoA; 1A, metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (metil-dienoil-CoA); 2A, metil-6-hidroxyciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (metil-6-hidroxi-monoenoil-CoA); 0B, benzoyl-CoA; 1B, ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (dienoil-CoA); 2B, 6-hidroxyciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (6-hidroxi-monoenoil-CoA).

Las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBdmbdO, mutante en la subunidad  $\beta$  de la hipotética 3-metilbenzoyl-CoA reductasa, se cultivaron anaeróbicamente en medio mínimo y condiciones de inducción del *cluster mbd*. Se empleó 3MBz como fuente exclusiva de carbono para *Azoarcus* sp. CIB y una mezcla de 3MBz y glutarato para *Azoarcus* sp. CIBdmbdO (dada su imposibilidad para crecer empleando 3MBz como única fuente de carbono, ver Fig. 12B). A partir de los cultivos se obtuvieron extractos celulares en condiciones anóxicas y se realizó un ensayo enzimático empleando 3-metilbenzoyl-CoA como sustrato (ver el apartado 6.3 de *Materiales y Métodos*). En estos experimentos se observó que los extractos celulares procedentes de la cepa *Azoarcus* sp. CIB cultivada en 3MBz poseían una actividad específica de  $16.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  para la conversión del 3-metilbenzoyl-CoA y de  $7.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  para el benzoyl-CoA (Figs.

15A y B), mientras que los extractos de *Azoarcus* sp. CIBdmbdO cultivados en presencia de 3MBz no mostraron actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa detectable ( $< 0.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Por otro lado, extractos de *Azoarcus* sp. CIB cultivado en glutarato (condiciones de no inducción de la ruta mbd) presentaron tan sólo un 10% de la actividad mostrada en condiciones de inducción. Estos resultados confirman la existencia de una actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa inducible en *Azoarcus* sp. CIB y sugieren que los genes *mbdONQP* son los responsables de dicha actividad.

Curiosamente, extractos de *Azoarcus* sp. CIB obtenidos de células cultivadas anaeróbicamente en benzoato y que, por lo tanto, expresaban la benzoil-CoA reductasa (BzdNOQP) mostraron una significativa actividad reductasa no sólo cuando se utilizó benzoil-CoA como sustrato sino también en presencia de 3-metilbenzoil-CoA (Figs. 15C y D). Estos resultados sugerían que las benzoil-CoA y 3-metilbenzoil-CoA reductasas eran capaces de reducir eficazmente tanto el benzoil-CoA como el 3-metilbenzoil-CoA. Para confirmarlo, se procedió al estudio de la actividad reductasa en cepas de *Azoarcus* sp. CIB que presentaban una benzoil-CoA reductasa (*Azoarcus* sp. CIBdbzdN) (López-Barragán *et al.*, 2004) o una 3-metilbenzoil-CoA reductasa (*Azoarcus* sp. CIBdmbdO) inactivas. La cepa *Azoarcus* sp. CIBdmbdO cultivada anaeróbicamente en benzoato, condición en la que se expresa el complejo benzoil-CoA reductasa BzdNOPQ, era capaz de catalizar indistintamente la reducción de 3-metilbenzoil-CoA (Fig. 15E) y de benzoil-CoA (Fig. 15F). A su vez, la cepa *Azoarcus* sp. CIBdbzdN cultivada anaeróbicamente en 3MBz, condición en la que sólo se expresa la reductasa MbdONQP, también podía catalizar la reducción de ambos derivados CoA (Figs. 15G y H).

Estos resultados sugieren que la benzoil-CoA reductasa (BzdNOPQ) y la 3-metilbenzoil-CoA reductasa (MbdONQP) de *Azoarcus* sp. CIB son capaces de reducir indistintamente benzoil-CoA y 3-metilbenzoil-CoA.

### 3.3. Análisis de la actividad metil-ciclohexa-1,5-dienocarbonil-CoA hidratasa

El análisis del *cluster mbd* reveló la presencia de tres genes adyacentes (*mbdXYW*) que podrían codificar las actividades enzimáticas conducentes a la  $\beta$ -oxidación y apertura del anillo del 3-metildienoil-CoA formado por la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa (Tabla 6). El producto del gen *mbdW* muestra similitud con proteínas de tipo

ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa, como Dch de *T. aromatica* (Breese *et al.*, 1998; Laempe *et al.*, 1998), BamR<sub>Gco</sub> de *G. metallireducens* (Peters *et al.*, 2007) y BamR<sub>Syn</sub> de *S. aciditrophicus* (Peters *et al.*, 2007). Este tipo de enzimas con actividad hidratasa actúa sobre el producto de la reducción del anillo aromático generado por la actividad benzoil-CoA reductasa, eliminando una de las dos insaturaciones e introduciendo un grupo hidroxilo; además pueden catalizar también esta reacción en el sentido reverso. MbdW podría realizar una función similar sobre el derivado metilado del ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA que se generaría por la acción del complejo MbdONQP sobre el 3-metilbenzoil-CoA.

A continuación actuaría el producto del gen *mbdX*, puesto que muestra similitud con la proteína Had de *T. aromatica* (Laempe *et al.*, 1999), la 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA deshidrogenasa que transforma el grupo enol resultante en el paso anterior en un grupo ceto. Finalmente, se produciría la apertura del anillo alicíclico por parte de MbdY, una metil-6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidrolasa que jugaría un papel similar al desempeñado por la proteína Oah de *T. aromatica* (Laempe *et al.*, 1999), hidrolasa con la que presenta similitud de secuencia (Tabla 6).

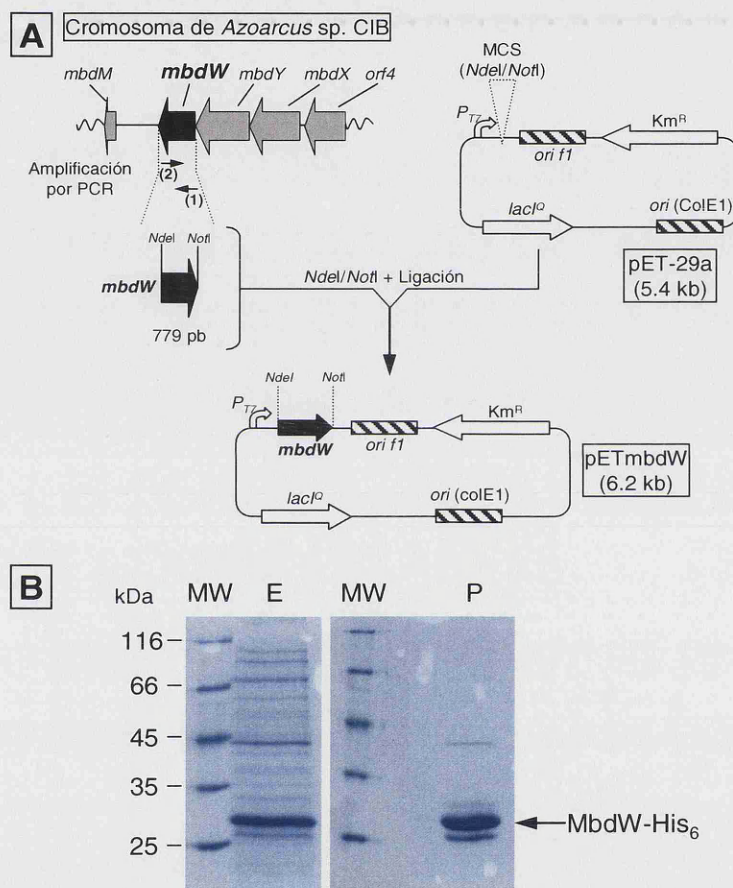
Durante la realización de esta Tesis Doctoral se inició la caracterización de la primera de estas tres actividades, todas ellas clave para la  $\beta$ -oxidación del compuesto alicíclico y la formación de un ácido dicarboxílico alifático (metil-hidroxipimelil-CoA).

### **3.3.1. Clonación e hiperexpresión del gen *mbdW* y purificación de la proteína MbdW**

El producto del gen *mbdW* presenta una elevada identidad de secuencia (60%) con ciclohexa-1,5-dieno-carboxil-CoA hidratasa (Tabla 6), lo que hacía sospechar que era responsable de la actividad hidratasa encargada de introducir un grupo hidroxilo en la molécula de metil-dienoil-CoA derivada de la reducción del 3-metilbenzoil-CoA. El gen *mbdW* se clonó en el vector de hiperexpresión pET-29a siguiendo la estrategia que aparece reflejada en la Figura 16A de tal forma que se generó una fusión que codifica seis histidinas en el extremo 3' del gen *mbdW*. El plásmido resultante, pETmbdW, se introdujo en la cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3), que fue cultivada aeróbicamente en medio LB para favorecer la hiperproducción de la proteína recombinante MbdW-His<sub>6</sub> (29.0 kDa). El proceso seguido para la purificación de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> (Fig. 16B) se detalla en el apartado 5.2.1 de *Materiales y Métodos*.



Con el objetivo de determinar el estado de oligomerización de MbdW se realizó una cromatografía de filtración en gel y se comparó el tiempo de elución de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> purificada con el de proteínas de masa molecular conocida (ver el apartado 5.3 de *Materiales y Métodos*). La masa molecular aparente calculada fue de aproximadamente 86 kDa. Dado que la masa molecular del monómero MbdW-His<sub>6</sub> es de (29.0 kDa), la conformación nativa de la proteína MbdW en solución podría ser la de un trímero, si bien no se puede descartar la conformación dimérica.

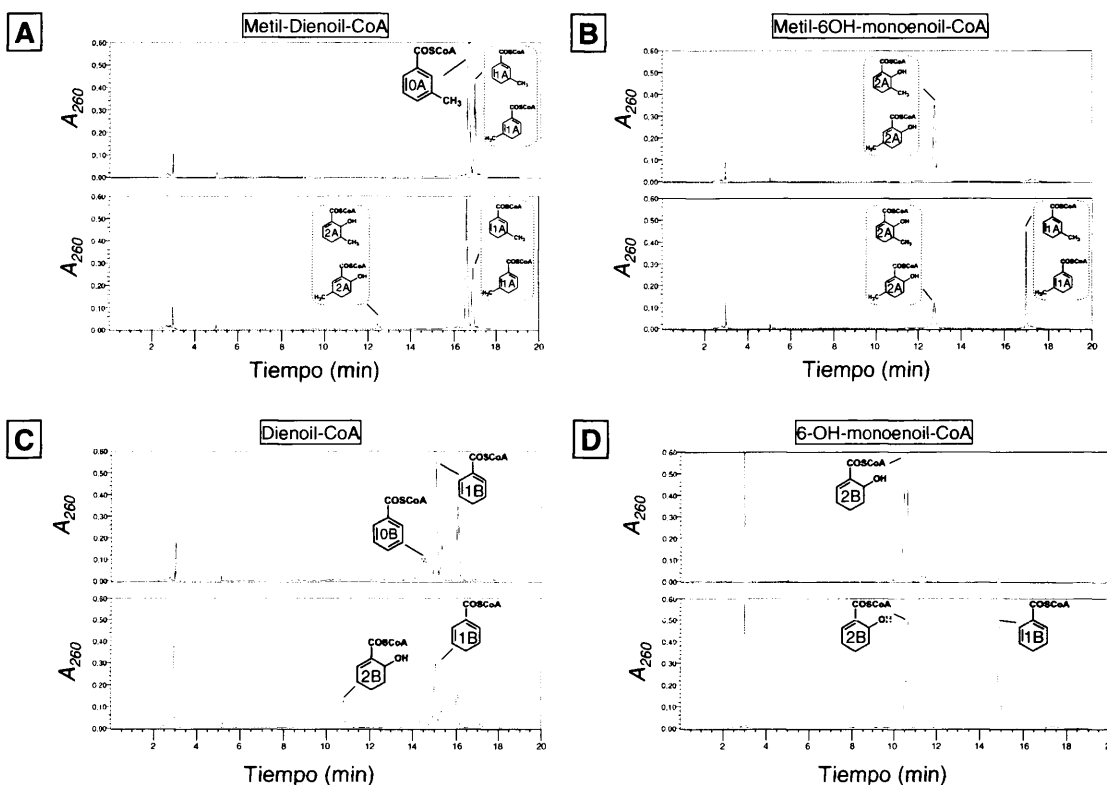


**Figura 16. Clonación e hiperproducción de MbdW. A)** Representación esquemática de la clonación del gen *mbdW* en el vector de expresión pET-29a. El gen *mbdW* se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB, empleando la pareja de oligonucleótidos: (1) *mbdW* NdeI 5' y (2) *mbdW* NotI 3' (Tabla 5). Las abreviaturas indicadas en el esquema son: *P<sub>T7</sub>* (promotor del gen 10 del bacteriófago T7), *Km<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a la kanamicina), *ori f1* (origen de replicación del bacteriófago F1), *ori* (origen de replicación ColE1), *MCS* (*Multiple Cloning Site*), *lacI<sup>Q</sup>* (gen que codifica el represor LacI del operón *lac*).

**B) Purificación de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> en extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdW).** Gel SDS-PAGE (12.5%) en el que se analizó la proteína purificada mediante el método descrito en la sección correspondiente de *Materiales y métodos*. Calle **MW**, marcadores de masa molecular (Fermentas). En el lado izquierdo de la imagen se detallan los tamaños de los marcadores (en kDa). Calle **E**, fracción soluble de un extracto de *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdW) en el que la proteína MbdW-His<sub>6</sub> se ha hiperproducido. Calle **P**, proteína MbdW-His<sub>6</sub> parcialmente purificada (29.0 kDa), cuya posición en el gel se señala con una flecha.

### 3.3.2. MbdW posee actividad metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa

Como se ha comentado anteriormente, las dienol-CoA hidratatasas caracterizadas poseen la capacidad de catalizar tanto la reacción de hidratación (reacción directa) como la de deshidratación (reacción reversa) de forma que se puede valorar su actividad en ambos sentidos de la reacción.



**Figura 17. Análisis mediante HPLC de la actividad enzimática de la proteína MbdW.** Se monitorizó la actividad de la proteína MbdW-His<sub>6</sub> purificada (0.68  $\mu$ M) tras un minuto de incubación con los siguientes sustratos: **A)** metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA 0.2 mM (metil-dienoil-CoA); **B)** metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA 0.2 mM (metil-6OH-monoenoil-CoA); **C)** ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA 0.2 mM (dienoil-CoA); **D)** 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA 0.2 mM (6OH-monoenoil-CoA). Las gráficas representan el perfil de retención de los compuestos CoA generados mediante la monitorización de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). En cada uno de los paneles, la mitad superior representa el perfil de retención de la molécula usada como sustrato en el ensayo (en rojo), mientras que la mitad inferior representa la desaparición de los sustratos y la generación de los productos tras la adición de MbdW-His<sub>6</sub> (azul y verde). Los paneles A) y B) muestran la transformación de los sustratos metilados de la enzima, en ambos sentidos de la reacción catalizada. Los paneles C) y D) muestran la acción de MbdW-His<sub>6</sub> sobre sus sustratos no metilados, es decir, los sustratos equivalentes en la ruta bzd de degradación anaeróbica del benzoato. En el interior de las gráficas los picos del cromatograma correspondientes con los diferentes compuestos se indican manteniendo la clave empleada en la Figura 15: **0A**, 3-metilbenzoil-CoA; **1A**, metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (metil-dienoil-CoA); **2A**, metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (metil-6OH-monoenoil-CoA); **0B**, benzoil-CoA; **1B**, ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (dienoil-CoA); **2B**, 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (6OH-monoenoil-CoA). El llamativo pico que se observa a los 16 min en el panel C) se corresponde con el compuesto ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA, un subproducto que se genera como resultado de una reducción adicional en la síntesis del dienoil-CoA.

En la Figura 17 se pueden observar los cromatogramas con los que se siguió la hidratación del (metil)-dienoil-CoA a (metil)-6-hidroxi-monoenoil-CoA y la reacción reversa de deshidratación del (metil)-6-hidroxi-monoenoil-CoA a (metil)-dienoil-CoA. En el ensayo se muestra que la proteína MbdW ejerce la actividad dienoil-CoA hidratasa y la reacción reversa tanto con el sustrato metilado como con el sustrato sin metilar.

Dada la dificultad para purificar el metil-dienoil-CoA y los elevados niveles de 3-metilbenzoil-CoA que contaminaban el compuesto purificado (Fig. 17A), se realizó un experimento control con metil-6OH-monoenoil-CoA más una cantidad de 3-metilbenzoil-CoA equivalente a la que contamina al metil-dienoil-CoA. El objetivo del ensayo consistía en comprobar mediante HPLC si la elevada concentración de 3-metilbenzoil-CoA podía afectar a los niveles de actividad hidratasa MbdW. Los resultados del ensayo (datos no mostrados) demostraron que no existía un efecto inhibidor del 3-metilbenzoil-CoA sobre la actividad de la proteína MbdW.

El 6-hidroxi-monoenoil-CoA es el compuesto que se aisló con mayor pureza y en mayor abundancia, por lo que se usó como sustrato en ensayos de actividad hidratasa monitorizados espectrofotométricamente (ver el apartado 6.4.2 de *Materiales y Métodos*) y en los que se comparó la actividad de las proteínas purificadas MbdW y la hidratasa equivalente BamR<sub>Syn</sub> de *S. aciditrophicus* (Peters *et al.*, 2007). La actividad específica calculada para la reacción reversa 6-hidroxi-monoenoil-CoA → dienoil-CoA mediante este ensayo fue de 478.90  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para MbdW y de 462.99  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  para BamR<sub>Syn</sub>.

Los ensayos de actividad enzimática llevados a cabo con la proteína MbdW purificada han confirmado su participación en la etapa inicial de la  $\beta$ -oxidación implicada en la degradación del producto de la reducción del 3-metilbenzoil-CoA. Además, se ha demostrado que también puede ejercer su actividad catalítica sobre el derivado dienoil-CoA del benzoil-CoA. Al igual que hemos observado con la reductasa MbdONQP, la proteína MbdW podría llevar a cabo su función tanto en la ruta *bzd* (degradación de benzoato) como en la ruta *mbd* (degradación de 3MBz). Presumiblemente mecanismos de regulación específica determinarán la producción de estas proteínas en condiciones en las que sea necesario degradar 3-metilbenzoil-CoA, mientras que las proteínas del *cluster bzd* se producirán cuando se necesite degradar benzoil-CoA. Por ello, y como continuación del trabajo de Tesis, se procedió a estudiar la regulación de la expresión de los genes *mbd*.

#### 4. Análisis transcripcional del *cluster mbd*

---

El análisis de la organización genética del *cluster mbd* revela que los genes catabólicos, de transporte y reguladores se disponen en al menos tres operones controlados por los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  (Fig. 18A) y están separados por distancias que oscilan entre los 636 y los 0 nucleótidos. Las mayores regiones intergénicas son *mbdW-mbdM* (636 pb), *mbdP-orf1* (621 pb), *orf5-orf6* (481 pb), *mbdB5-mbdA* (231 pb), *mbdM-korA2* (202 pb) y *koriB2-orf5* (158 pb).

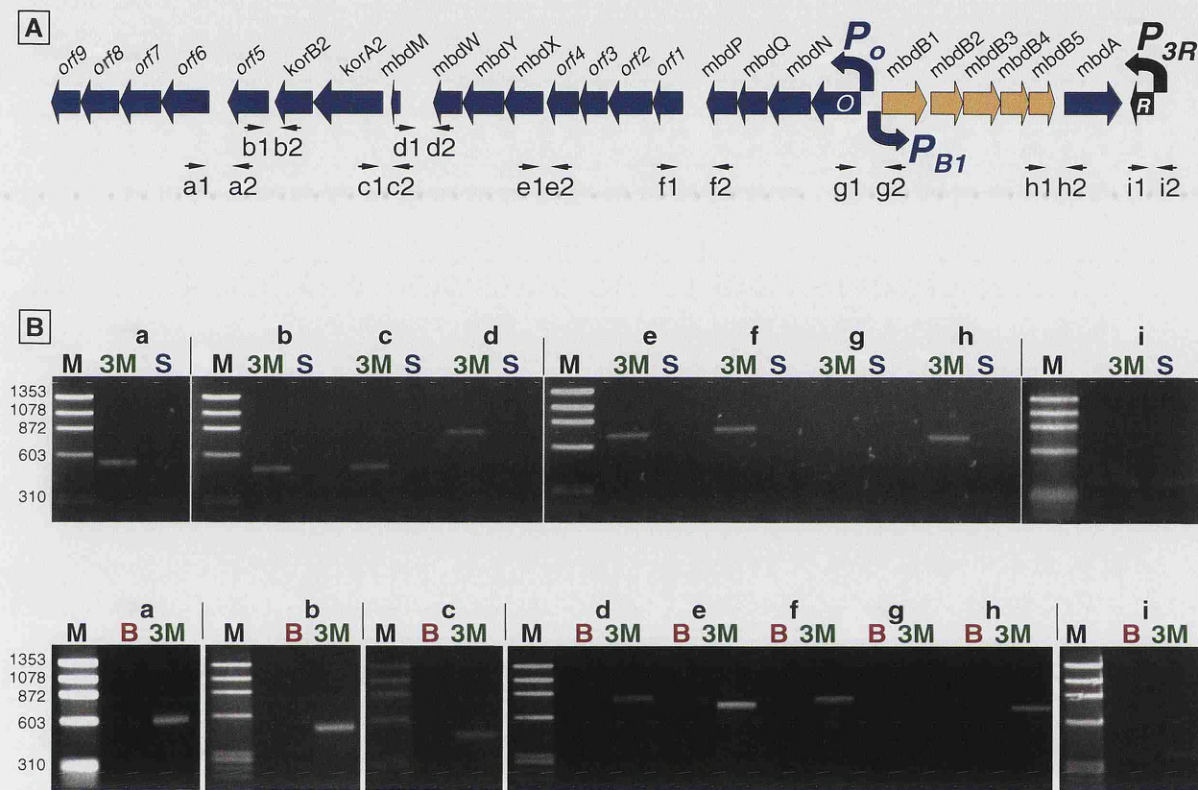
Con el objetivo de comprobar la existencia de las unidades transcripcionales propuestas controladas por los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  y si su expresión era inducible por 3MBz, se procedió a cultivar *Azotarcus* sp. CIB en condiciones desnitrificantes en medio mínimo MC, empleando como única fuente de carbono y energía 3MBz, succinato (condición control de crecimiento en una fuente de carbono no aromática) o benzoato (condición control de crecimiento en una fuente de carbono aromática). Se extrajo RNA total de los cultivos y se analizó la expresión de diferentes regiones intergénicas del *cluster mbd* mediante RT-PCR. (Fig. 18B)

El análisis de los productos de las reacciones de RT-PCR relacionadas con los genes *mbd* catabólicos y de transporte sólo reveló unos niveles de expresión significativos cuando la bacteria *Azotarcus* sp. CIB era cultivada en 3MBz, pero no cuando la misma cepa era cultivada en succinato o benzoato (Fig. 18B). Estos resultados confirman que la expresión de los genes *mbd* catabólicos y de transporte es inducible y dependiente del metabolismo de 3MBz en *Azotarcus* sp. CIB. El benzoato, sustrato de la ruta central bzd y cuyas actividades enzimáticas son equivalentes a las de la ruta mbd, no es capaz, sin embargo, de inducir la expresión de los genes *mbd* catabólicos. Por otro lado, el análisis del gen *mbdR* reveló su expresión constitutiva en las condiciones analizadas, ya que mantenía un nivel constante de expresión independientemente de la fuente de carbono en la que se hubieran realizado los cultivos.

El estudio de la cotranscripción de diferentes parejas de genes que flanquean las mayores regiones intergénicas del *cluster mbd* a través del análisis de los productos de las reacciones de RT-PCR, sugiere la existencia de los dos operones divergentes propuestos: un operón controlado por el promotor  $P_O$  y que se extendería desde el gen *mbdD* hasta, al menos, *orf6*, y un operón controlado por el promotor  $P_{B1}$  que se extendería desde el



gen *mbdB1* hasta *mbdA* (Fig. 18A). Además de estos dos operones divergentes, el presunto gen regulador *mbdR* constituye un operón monocistrónico controlado por el promotor  $P_{3R}$ .



**Figura 18. Organización transcripcional del *cluster mbd*.** A) Esquema de la organización transcripcional del *cluster mbd* que muestra los dos posibles operones divergentes que contienen a los genes catabólicos (flechas azules) y de transporte (flechas amarillas) y el operón regulador *mbdR* (flecha negra). Los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  se indican con flechas curvadas. Las regiones intergénicas cuya expresión ha sido analizada se representan con una letra y la secuencia de los oligonucleótidos empleados para su amplificación se incluye en la Tabla 5: **a1**, *orf6* R1; **a2**, *orf5* F1; **b1**, *orf5* R1; **b2**, *korB2* F1; **c1**, *korA2* R1; **c2**, 3MBzFed F1; **d1**, 3MBzFed R1; **d2**, *mbdW* F1; **e1**, *mbdX* R1; **e2**, *orf4* F1; **f1**, *orf1* R1; **f2**, *mbdN* F1; **g1**, *bcrB* R2; **g2**, *mbdB1* R1; **h1**, *mbdB5* F1; **h2**, *mbdA* R2; **i1**, *mbdR*-A3; **i2**, *mbdR*-A5. B) Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos con los oligonucleótidos reflejados en el panel A. Las células de *Azoarcus* sp. CIB utilizadas para la extracción del RNA total se cultivaron en condiciones desnitrificantes en medio mínimo MC hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento empleando 3MBz 3 mM, (calles **3M**), succinato 0.2% (calles **S**) o benzoato 3 mM (calles **B**). La extracción de RNA y las reacciones de RT-PCR fueron realizadas tal y como se indica en el apartado 3 de *Materiales y Métodos*. Las calles M contienen DNA del fago  $\Phi$ X-174, digerido con la enzima de restricción *HaeIII*, como indicador de masa molecular. En el margen izquierdo de las imágenes de los geles se indican los tamaños de los marcadores (en pb).

## 5. Caracterización de los promotores divergentes del *cluster mbd*: $P_O$ y $P_{B1}$

---

El análisis transcripcional reveló la presencia de, al menos, dos unidades transcripcionales en las que se incluyen los genes responsables de las enzimas implicadas en la ruta central *mbd*. Para caracterizar los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  se procedió a determinar el sitio de inicio de la transcripción de los correspondientes operones así como a la clonación de los promotores en un vector apropiado para el estudio de su actividad.

### 5.1. Identificación del punto de inicio de la transcripción de los genes *mbdO* y *mbdB1*

Para determinar el punto de inicio de la transcripción (+1) de los genes *mbdO* (promotor  $P_O$ ) y *mbdB1* (promotor  $P_{B1}$ ) se extrajo RNA total a partir de células de *Aerobacillus* sp. CIB cultivadas en 3MBz y en benzoato (condición control). En el apartado 3.5 de *Materiales y Métodos* se indica el protocolo de extensión por cebador (*primer extension*) empleado.

En la Figura 19A se muestra el punto de inicio de la transcripción de los genes *mbdO* y *mbdB1*. En ambos casos, la posición +1 de los promotores se ubica en una G, localizada a 137 pb del codón de inicio del gen *mbdO* (promotor  $P_O$ ) y a 138 pb del codón de inicio del gen *mbdB1* (promotor  $P_{B1}$ ). En el caso del promotor  $P_O$ , la existencia de productos de extensión más pequeños podría ser la evidencia de reacciones parciales de extensión por parte de la retrotranscriptasa.

La identificación del sitio de inicio de la transcripción permitió proponer las cajas -10 y -35 de interacción con la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa (Fig. 19B). Mientras que las cajas -35 mantienen la secuencia consenso (TTGACA), las cajas -10 se diferencian en dos ( $P_{B1}$ ) y tres ( $P_O$ ) bases respecto al consenso TATAAT (Dombroski, 1997). En el caso del promotor  $P_O$  la distancia que separa las cajas -10 y -35 es de 17 pb, mientras que en el promotor  $P_{B1}$  es de 16 pb. La distancia (268 pb) que separa las posiciones +1 de los genes *mbdO* y *mbdB1* sugiere que  $P_O$  y  $P_{B1}$  son dos promotores divergentes pero no solapantes (Fig. 19C).





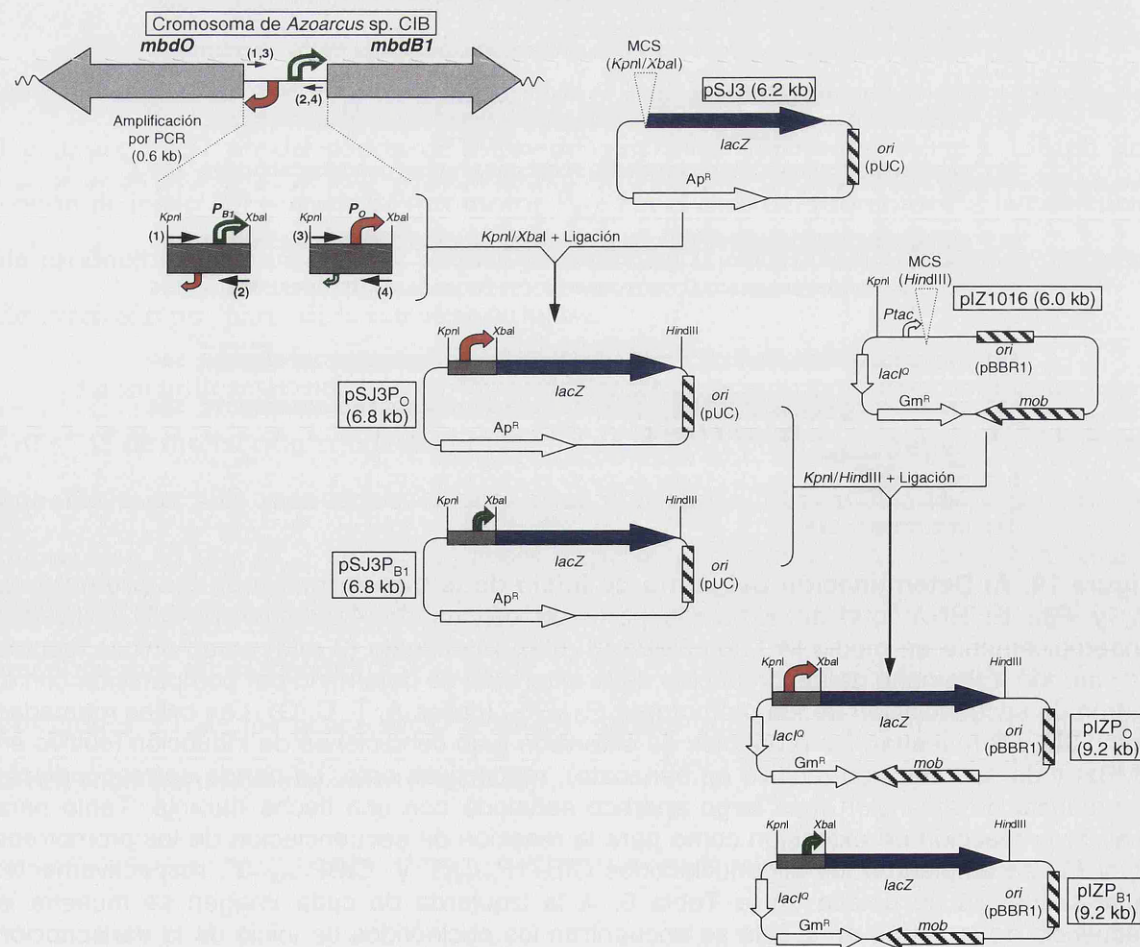


**Figura 19 (Continuación). B) Secuencia de la región -10/-35 y del inicio de la transcripción en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .** Las cajas -10 y -35 de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  aparecen recuadradas en verde. Los sitios de inicio de la transcripción (+1) se detallan subrayados en verde en la hebra codificante.

**C) Secuencia de la región intergénica  $mbdO$ - $mbdB1$ .** Se mantiene el código de colores del panel B) para las cajas -10/-35 y el punto de inicio de la transcripción. El codón de inicio de los genes  $mbdO$  y  $mbdB1$  aparece señalado en azul, y la secuencia de unión al ribosoma (RBS) se ha recuadrado con una línea negra discontinua. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación mediante PCR de las sondas empleadas para los experimentos de interacción *in vitro* proteína-DNA aparecen sombreados en naranja, y su secuencia detallada en la Tabla 5. La secuencia que se extiende desde las cajas -35 de cada promotor hacia cada codón de inicio aparece sombreada en amarillo.

## 5.2. Clonación y actividad de los promotores $P_O$ y $P_{B1}$ en *E. coli* y *Azoarcus* sp. CIB

Con el objetivo de continuar con el estudio de los promotores divergentes del *cluster mbd* se procedió a clonar la región intergénica situada entre los genes  $mbdO$  y  $mbdB1$  en el plásmido de búsqueda de promotores pSJ3 (Tabla 4). De esta forma se construyeron los vectores pSJ3 $P_O$  y pSJ3 $P_{B1}$ , en los que la región que contiene los promotores objeto de estudio,  $P_O$  y  $P_{B1}$ , queda fusionada traduccionalmente con el gen testigo *lacZ* (Fig. 20).





**Figura 20** (página anterior). **Esquema de la estrategia empleada para la construcción de las fusiones traduccionales  $P_O::lacZ$  y  $P_{B_I}::lacZ$ .** La región intergénica localizada entre los genes *mbdO* y *mbdB1* se amplificó mediante PCR a partir de DNA genómico. Los oligonucleótidos empleados fueron (1) *PmbdO KpnI* 5', (2) *PmbdO XbaI* 3', (3) *PmbdB1 KpnI* 5' y (4) *PmbdB1 XbaI* 3' (secuencia detallada en la Tabla 5). Estos cebadores introducen dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* en los extremos 5' y 3' del fragmento amplificado, de tal forma que la diana *XbaI* de ambos fragmentos permite generar una fusión traduccional de los primeros 3 nt del gen estructural *mbdO* y *mbdB1* con el gen testigo *lacZ* en el vector de búsqueda de promotores pSJ3. Dado que el vector pSJ3 no es capaz de replicar en *Azoarcus* sp. CIB, se procedió a subclonar las fusiones traduccionales como un fragmento *KpnI-HindIII* de aproximadamente 3.7 kb en el vector de amplio rango de hospedador pIZ1016 y de forma que el promotor *Ptac* del plásmido pIZ1016 es eliminado, evitando así cualquier interferencia en el estudio del promotor clonado.

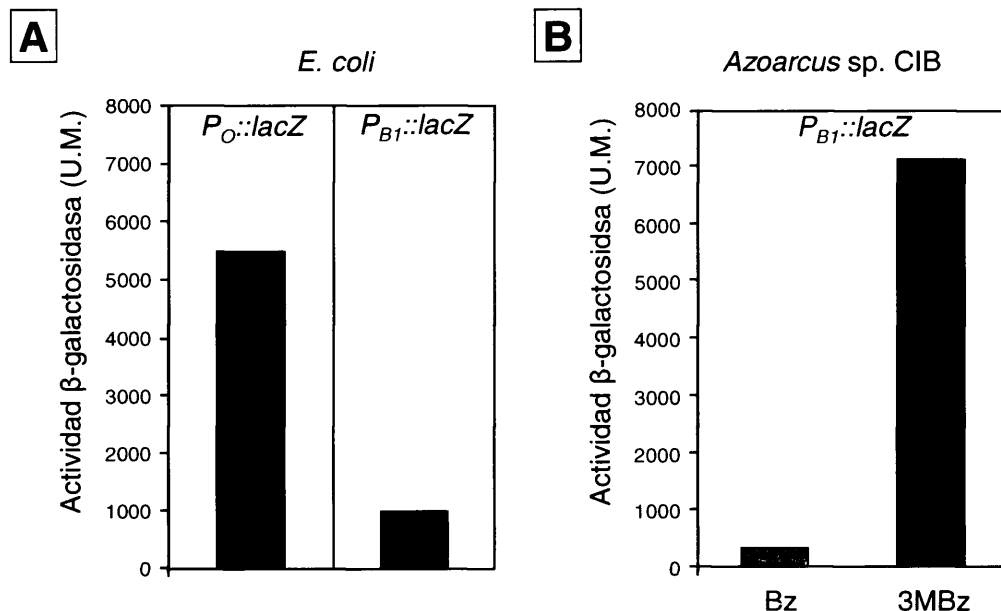
La región intergénica clonada se representa en color gris, los promotores  $P_O$  (naranja) y  $P_{B_I}$  (verde) con flechas curvadas, los genes responsables de las resistencias a antibióticos ( $Ap^R$ ,  $Gm^R$ ) y del represor del promotor *lac* (*lacI*) con flechas blancas. El gen *lacZ* se representa con un flecha azul, los orígenes de replicación *ori*(pUC) y *ori*(pBBR1) con rectángulos rayados y el de movilización de los plásmidos (*mob*) con flechas rayadas.

Dado que el plásmido pSJ3 no es capaz de replicar en *Azoarcus* sp. CIB, se procedió a subclonar las fusiones traduccionales  $P_O::lacZ$  y  $P_{B_I}::lacZ$  en el plásmido de amplio rango de hospedador pIZ1016 (Tabla 4), lo que dio lugar a los plásmidos pIZP<sub>O</sub> ( $P_O::lacZ$ ) y pIZP<sub>B<sub>I</sub></sub> ( $P_{B_I}::lacZ$ ) (Fig. 20).

La actividad de los promotores  $P_O$  y  $P_{B_I}$  se determinó inicialmente en la cepa *E. coli* DH10B, portadora de los plásmidos pIZP<sub>O</sub> o pIZP<sub>B<sub>I</sub></sub>. Para ello se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de ambas cepas y se comprobó que los promotores  $P_O$  y  $P_{B_I}$  eran activos en este sistema heterólogo, de tal forma que  $P_O$  es significativamente más activo que  $P_{B_I}$  (Fig. 21A). Estos resultados además sugerían que ambos promotores no estaban sometidos a un control dependiente de un activador específico de *Azoarcus* sp. CIB.

Cabe destacar que la actividad del promotor  $P_O$  estaba sujeta a significativas variaciones en diferentes experimentos, y que el crecimiento de la cepa portadora del plásmido pIZP<sub>O</sub> se veía claramente afectado (datos no mostrados). Este fenotipo se observó en diferentes cepas de *E. coli* (por ejemplo DH10B y MC4100) y en diferentes condiciones de cultivo (por ejemplo medio rico, medio mínimo, presencia de oxígeno y anoxia). Además, no se consiguió mantener con éxito la construcción pIZP<sub>O</sub> cuando se transfirió a *Azoarcus* sp. CIB. Como hemos visto en el apartado 4 de *Resultados*, el promotor  $P_O$  es responsable de la transcripción de una serie de genes que se extiende a lo largo de, al menos, 21.7 kb. La actividad promotora necesaria para formar un transcrito de tal envergadura podría generar inestabilidad genética cuando dicho promotor se encuentre en multicopia en la cepa hospedadora. A causa de esta inestabilidad, los estudios *in vivo* realizados en esta Tesis Doctoral se han centrado en la caracterización del promotor  $P_{B_I}$ .

El plásmido pIZP<sub>B1</sub> se introdujo en *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental. La realización de ensayos  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>B1</sub>) mostró que el promotor  $P_{B1}$  es más activo en el sistema homólogo que en un sistema heterólogo, y que su actividad se ve significativamente incrementada en células que han sido cultivadas en presencia de 3MBz (Fig. 21B), lo que está de acuerdo con la inducción observada mediante ensayos de RT-PCR (Fig. 18B).



**Figura 21. Expresión de las fusiones traduccionales  $P_O::lacZ$  y  $P_{B1}::lacZ$ .** **A)** Medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller, U.M.) en células de *E. coli* DH10B que contienen las fusiones traduccionales  $P_O::lacZ$  (plásmido pIZP<sub>O</sub>) y  $P_{B1}::lacZ$  (plásmido pIZP<sub>B1</sub>). Las células fueron cultivadas en medio LB. **B)** Medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller, U.M.) en células de *Azoarcus* sp. CIB portadoras del plásmido pIZP<sub>B1</sub>. Las células han sido cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo MC suplementado con benzoato 3 mM (Bz) o 3MBz 3 mM (3MBz) como únicas fuentes de carbono. Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron tal y como se indica en el apartado 6.1 de *Materiales y Métodos*. Los datos mostrados son el resultado de un solo experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos independientes y presentaron una desviación estándar inferior al 10% (salvo en el caso de la cepa de *E. coli* portadora del plásmido pIZP<sub>O</sub>, en la que la desviación estándar fue del 20%).

## 6. Caracterización de la regulación transcripcional específica de los promotores divergentes del *cluster mbd*

El extremo 3' del *cluster mbd* contiene el gen *mbdR* que codifica un presunto regulador transcripcional de la familia TetR (Tabla 6). Con el objetivo de profundizar en la regulación transcripcional específica del *cluster mbd* se procedió a estudiar el gen *mbdR* y su producto proteico.

## 6.1. MbdR es un regulador transcripcional de los promotores $P_O$ y $P_{B1}$

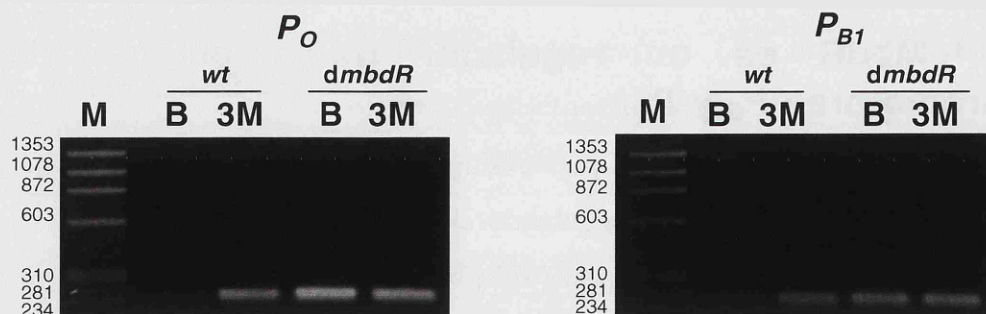
Como primera aproximación para evaluar la función del gen *mbdR* se procedió a generar un mutante en dicho gen siguiendo el esquema descrito en la Figura 12. Para ello se amplificó un fragmento interno (524 pb) del gen *mbdR* con los oligonucleótidos 5' *mbdR* mut2 y 3' *mbdR* mut2 (Tabla 5) que fue clonado en el vector suicida pK18*mob*, dando lugar al plásmido pK18*mbdR*new (Tabla 4). Dicho plásmido se transfirió por conjugación a *Azoarcus* sp. CIB y, mediante recombinación homóloga, se generó una inserción en la copia cromosómica del gen *mbdR* que dio lugar a la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*mbdR*.

La cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*mbdR* se cultivó anaeróticamente en medio mínimo MC complementado con 3MBz como única fuente de carbono y su crecimiento fue similar al observado con la estirpe silvestre *Azoarcus* sp CIB. Este resultado sugería que el gen *mbdR* no codificaba un activador transcripcional necesario para la expresión de los genes *mbd*.

Para confirmar que el producto del gen *mbdR* controla la actividad de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  se procedió a cultivar anaeróticamente las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*mbdR* en benzoato (condición de no inducción) o 3MBz (condición de inducción del *cluster mbd*). A partir de estos cultivos se extrajo RNA total y, siguiendo el protocolo indicado en la sección 3 de *Materiales y Métodos*, se analizó la actividad de los promotores mediante RT-PCR (Fig. 22). Mientras que la actividad de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  es inducible en la cepa *Azoarcus* sp. CIB cultivada en 3MBz, en *Azoarcus* sp. CIB*mbdR* la actividad se vuelve constitutiva, observándose niveles similares de transcrito tanto en condiciones de inducción (crecimiento en 3MBz) como de no inducción (crecimiento en benzoato).

Además, mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se observó que la actividad de la fusión  $P_{B1}::lacZ$  en la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*mbdR* era similar en células cultivadas en benzoato o en 3MBz (datos no mostrados).

Como conclusión, estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que el producto del gen *mbdR* es un represor transcripcional de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .



**Figura 22. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de los promotores divergentes del *cluster mbd* de *Azoarcus* sp. CIB.** Las células de *Azoarcus* sp. CIB (*wt*) y de *Azoarcus* sp. CIB*dmbdR* (*dmbdR*) utilizadas para la extracción del RNA total se cultivaron en condiciones desnitrificantes hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento empleando benzoato 3 mM (calles **B**) o 3MBz 3 mM (calles **3M**) como fuentes de carbono. La extracción de RNA y las reacciones de RT-PCR fueron realizadas tal y como se indica en el apartado 3 de *Materiales y Métodos*. Los oligonucleótidos empleados para amplificar los productos de PCR fueron las parejas *PmbdO* F1 / *bcrB* R2 (*P<sub>O</sub>*) y *PmbdB1* F1 / *mbdB1* R1 (*P<sub>B1</sub>*), cuya secuencia se detalla en la Tabla 5. Las calles M contienen DNA del fago ΦX-174, digerido con la enzima de restricción *Hae*III, como indicador de masa molecular. En el margen izquierdo de las imágenes de los geles se indican los tamaños de los marcadores (en pb).

## 6.2. Caracterización del regulador MbdR

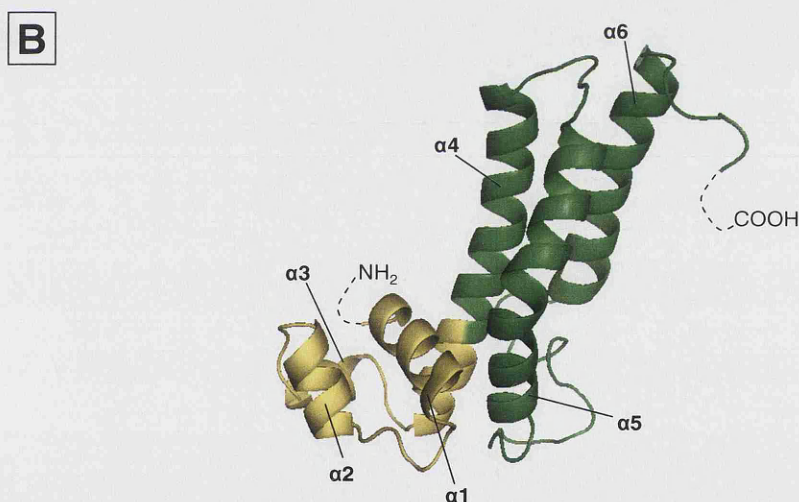
### 6.2.1. Análisis *in silico* de la estructura de la proteína MbdR

La comparación de la secuencia de aminoácidos del regulador MbdR (214 aa, 23.8 kDa) con las bases de datos de proteínas reveló su pertenencia a la familia de reguladores transcripcionales TetR (para revisión sobre esta familia ver Ramos *et al.*, 2005 y Yu *et al.*, 2010). La proteína MbdR posee en su extremo amino-terminal (residuos 1 al 64) una secuencia de reconocimiento de DNA propia de esta familia de reguladores (Hinrichs *et al.*, 1994). Sin embargo, el extremo carboxilo-terminal de la proteína MbdR no presenta una identidad de secuencia significativa con proteínas reguladoras caracterizadas, lo que permite hipotetizar que éste es un dominio de reconocimiento para un inductor específico. La proteína caracterizada que posee una mayor identidad de secuencia de aminoácidos (23%) con MbdR es el regulador transcripcional AcrR de *E. coli* (Fig. 23A), que controla la expresión del transportador AcrAB implicado en la resistencia frente a diferentes compuestos tóxicos para la bacteria (Li *et al.*, 2006).

Utilizando la estructura tridimensional (3D) del regulador AcrR, se procedió a realizar un modelado de la estructura de la proteína MbdR (Fig. 23B). Sólo forman parte del modelo los aminoácidos que se extienden desde la posición 18 a la 158 debido a la escasa similitud de secuencia del extremo carboxilo-terminal de la proteína MbdR con el correspondiente de la proteína AcrR. Según el modelo, la proteína presenta tres hélices



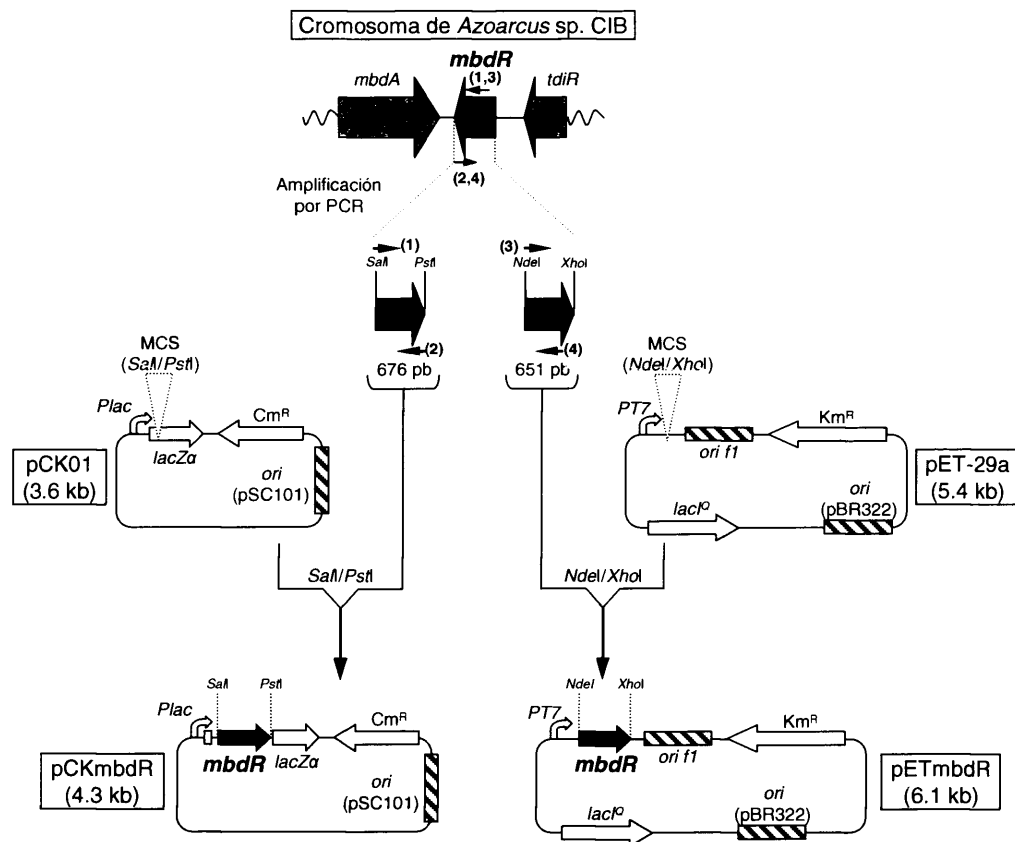
**A**



101

## 6.2.2. Clonación y purificación de la proteína MbdR

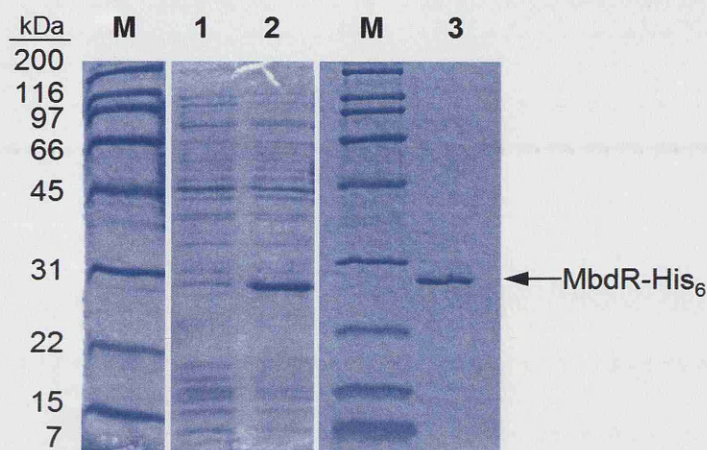
El gen *mbdR* se clonó en los vectores pCK01 y pET-29a, dando lugar a las construcciones pCKmbdR y pETmbdR (Fig. 24). El plásmido pCKmbdR contiene el gen *mbdR* bajo el control del promotor *Plac* y es un vector de expresión cuyo origen de replicación y resistencia antibiótica es compatible con los plásmidos derivados de pIZ1016 (pIZP<sub>O</sub> y pIZP<sub>B1</sub>), lo que permite su utilización en los experimentos *in vivo* de control de la fusión traduccional *P<sub>B1</sub>::lacZ* (ver más adelante). El plásmido pETmbdR se empleó como vector de hiperexpresión y purificación, puesto que introduce seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal de MbdR, permitiendo su purificación mediante un solo paso de cromatografía de afinidad en columnas de níquel.



**Figura 24. Representación esquemática de la clonación del gen *mbdR* en los vectores de expresión pCK01 y pET-29a.** El gen *mbdR* fue amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de *Azoarcus* sp. CIB, empleando los oligonucleótidos: (1) *mbdR* *SaI* 5', (2) *mbdR* *PstI* 3', (3) *mbdR* *NdeI* 5' y (4) *mbdR* *XhoI* 3'. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 5. Las abreviaturas indicadas en el esquema son : *Plac* (promotor *lac*), *PT7* (promotor del gen 10 del bacteriófago T7), *lacZα* (fragmento que codifica la subunidad α de la β-galactosidasa), *Km<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia a la kanamicina), *Cm<sup>R</sup>* (gen que confiere resistencia al cloranfenicol), *lacI<sup>Q</sup>* (gen que codifica el represor LacI del operón *lac*), *ori f1* (origen de replicación del bacteriófago F1), *ori(pSC101)* (origen de replicación del plásmido pSC101), *ori(pBR322)* (origen de replicación de la familia de plásmidos derivados de pBR322), *MCS* (*Multiple Cloning Site* de los diferentes plásmidos).



La proteína MbdR-His<sub>6</sub> (223 aa) tiene una masa molecular de 24.9 kDa y su purificación se realizó a partir de cultivos de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdR) (Fig. 25), tal y como se detalla en el apartado 5.2.2 de *Materiales y Métodos*. La proteína MbdR purificada (5 mg/ml) presentó una vida superior a los seis meses almacenada a 4°C.

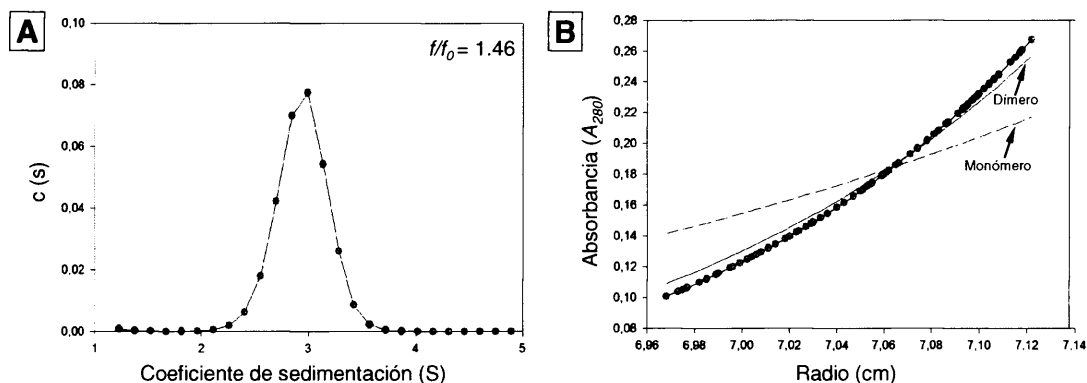


**Figura 25. Purificación de la proteína MbdR-His<sub>6</sub> a partir de extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdR).** Gel SDS-PAGE (12.5%) en el que se analizó la proteína purificada mediante el método descrito en la sección correspondiente de *Materiales y métodos*. Las calles **M** se corresponden con los marcadores de masa molecular *Broad Range* de BioRad. En el lado izquierdo de la imagen se detallan los tamaños de los marcadores (en kDa). En la calle **1** se muestra un extracto control (12 µg proteína total) de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pET-29a. En la calle **2** se muestra un extracto (8 µg proteína total) de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pETmbdR) en condiciones de hiperproducción de la proteína MbdR-His<sub>6</sub>. La calle **3** muestra la proteína MbdR-His<sub>6</sub> purificada (3.3 µg), cuya posición en el gel se señala con una flecha.

### 6.2.3. Determinación de la estructura nativa del regulador MbdR

La técnica seleccionada para el estudio del estado oligomérico de la proteína MbdR fue la ultracentrifugación analítica. Para ello se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación con la proteína MbdR-His<sub>6</sub>, tal y como se detalla en el apartado 8 de *Materiales y Métodos*.

El coeficiente de sedimentación calculado es de 2.9 S. El índice de fricción  $f/f_0$  posee un valor de 1.46, lo que indica que se trata de una proteína ligeramente elongada. Los resultados obtenidos en equilibrio de sedimentación mostraron especies compatibles con un estado de asociación dimérico en solución para la proteína MbdR-His<sub>6</sub> (Fig. 26).



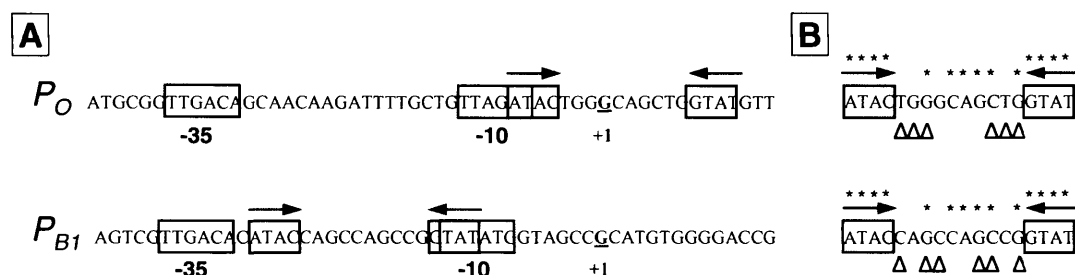
**Figura 26. Estudio del estado oligomérico del regulador MbdR. A) Análisis mediante velocidad de sedimentación de la proteína purificada MbdR-His<sub>6</sub>.** Se representa el perfil de distribución de concentraciones (eje de ordenadas) frente al coeficiente de sedimentación (eje de abscisas). No se observaron variaciones en el coeficiente de sedimentación (2.9 S) con la concentración de proteína en los rangos de concentraciones analizados (de 11 a 46  $\mu$ M). También aparece indicado el índice de fricción  $f/f_0$  determinado. **B) Análisis mediante equilibrio de sedimentación de la proteína purificada MbdR-His<sub>6</sub>.** Gradiente en equilibrio de sedimentación de la proteína MbdR-His<sub>6</sub>. Se representa la  $A_{280}$  frente al radio (cm). Los círculos rellenos en gris representan las medidas realizadas, la línea continua representa el gradiente teórico correspondiente con un dímero de la proteína y la línea discontinua representa el gradiente teórico para un monómero. Los detalles experimentales de los estudios de velocidad y equilibrio de sedimentación se indican en el apartado 8 de *Materiales y Métodos*.

### 6.3. Estudios sobre la interacción del regulador MbdR con los promotores $P_O$ y $P_{B1}$

#### 6.3.1. Análisis *in silico* de los promotores $P_O$ y $P_{B1}$

El estudio detallado de la secuencia de los promotores divergentes  $P_O$  y  $P_{B1}$  del *cluster mbd* reveló la presencia de una secuencia palindrómica, ATAC-10 pb-GTAT, conservada en ambos. Entre las cajas palindrómicas conservadas, ATAC y GTAT, se localizan otros nucleótidos que extienden el palíndromo pero algunos de ellos no están conservados en los dos promotores (Fig. 27). Cabe destacar que las cajas palindrómicas detectadas solapan con regiones imprescindibles para el inicio de la transcripción dependiente de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa. En el caso del promotor  $P_O$ , la región palindrómica ocupa la región -10 y el punto de inicio de la transcripción, mientras que en el caso del promotor  $P_{B1}$  solapa con la caja -10 y se extiende hacia la caja -35. Dado que la posición de estas secuencias es compatible con la zona de reconocimiento del DNA por parte de un represor transcripcional, y que el gen *mbdR* codifica un represor específico en el *cluster mbd*, la secuencia ATAC-10 pb-GTAT parecía una buena candidata para ser considerada como la región operadora de la proteína MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .



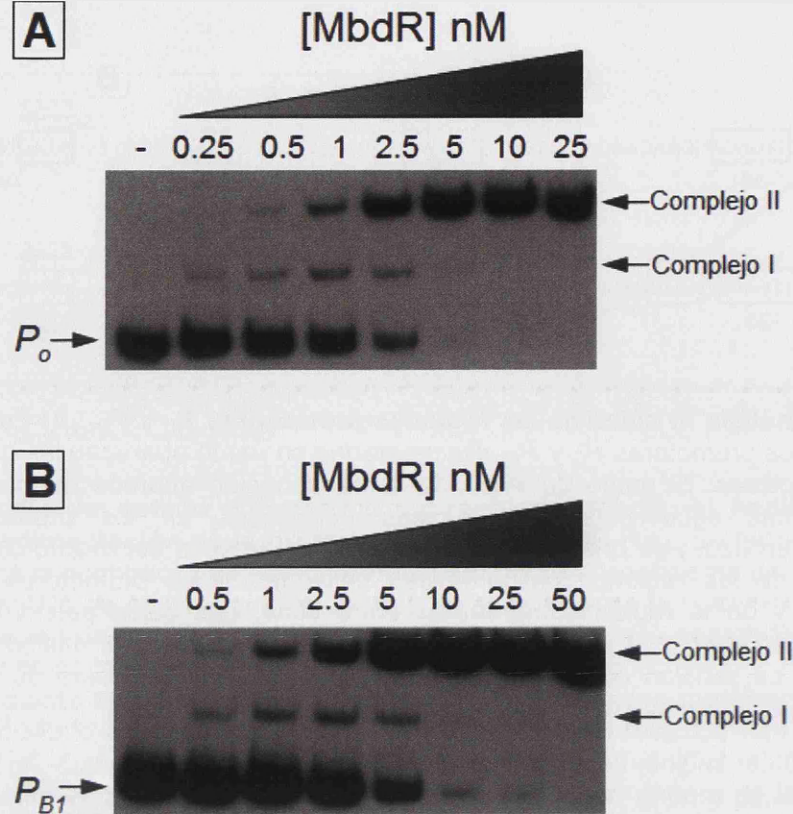


**Figura 27. Análisis *in silico* de las regiones promotoras  $P_O$  y  $P_{B1}$ .** **A)** Esquema ampliado de las regiones promotoras  $P_O$  y  $P_{B1}$ . Recuadradas en verde aparecen las cajas -10 y -35 de ambos promotores. El punto de inicio de la transcripción aparece marcado en naranja y subrayado. Las secuencias palindrómicas detectadas en los promotores aparecen recuadradas en azul y su orientación señalada por una flecha del mismo color. **B)** Esquema comparativo de las regiones palindrómicas halladas en los promotores divergentes del *cluster mbd* y de la región comprendida entre ellas. Las cajas palindrómicas aparecen recuadradas en azul y su orientación señalada por una flecha del mismo color, las bases conservadas se señalan con un asterisco y las bases situadas fuera de las cajas, y que extienden el palíndromo, están señaladas por triángulos rojos.

### 6.3.2. Estudios *in vitro* de la interacción entre MbdR y los promotores $P_O$ y $P_{B1}$

Los promotores divergentes del *cluster mbd* se utilizaron para generar las sondas  $P_O$  (271 pb, se extiende desde la posición -113 a +150 respecto al inicio de la transcripción) y  $P_{B1}$  (251 pb, se extiende desde la posición -100 a +143) (Fig. 19C), empleadas en los experimentos de interacción *in vitro* con la proteína MbdR purificada.

Mediante ensayos de retardo en gel se observaron complejos de unión entre las sondas empleadas y la proteína MbdR (Fig. 28). La sonda  $P_O$  es retardada en su totalidad a una concentración de MbdR de ~5 nM ( $K_d \sim 1.8$  nM), mientras que la sonda  $P_{B1}$  es retardada a ~25 nM ( $K_d \sim 3.7$  nM). De esta forma se confirmó la existencia de una interacción directa entre la proteína MbdR y los promotores objeto de estudio. El análisis de los ensayos de retardo en gel reveló la existencia de dos complejos de interacción. El complejo mayoritario y de mayor tamaño (complejo II) responde al aumento en la concentración de proteína de tal forma que el aumento de la cantidad de DNA unido a la proteína es proporcional a la disminución de la cantidad de sonda libre. El segundo complejo (complejo I) es minoritario, se localiza entre el complejo mayoritario y la sonda libre y desaparece cuando se alcanzan concentraciones de proteína superiores a la  $K_d$ .

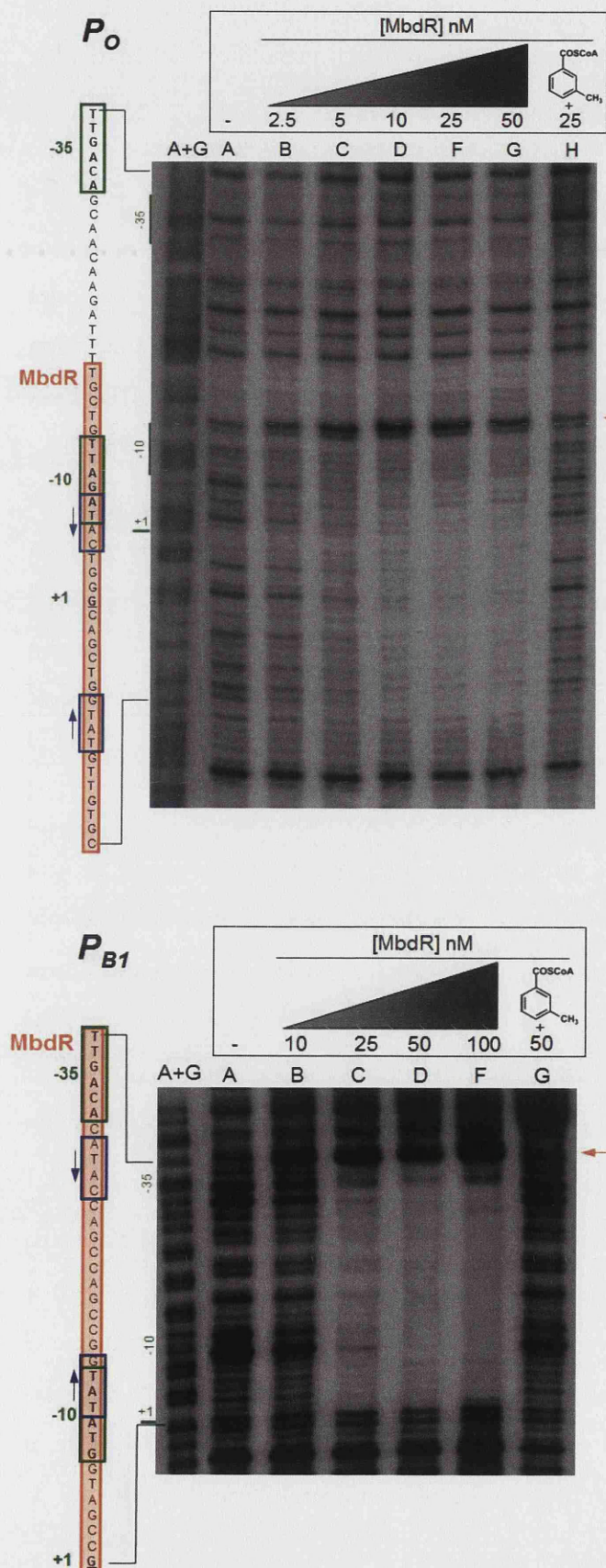


**Figura 28. Ensayo *in vitro* de interacción de la proteína MbdR con los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .** Ensayos de retardo en gel en los que se empleó la proteína MbdR-His<sub>6</sub> purificada y la sonda  $P_O$  (271 pb), que contiene al promotor  $P_O$  (panel A), y la sonda  $P_{B1}$  (251 pb), que contiene al promotor  $P_{B1}$  (panel B), según se detalla en el apartado 7.2 de *Materiales y Métodos*. Las calles de los geles aparecen rotuladas con la concentración (nM) de proteína MbdR-His<sub>6</sub> purificada que se ha añadido a cada una de las reacciones de retardo. Las calles rotuladas con un signo “-” corresponden a reacciones control de retardo, a las que no se les ha añadido proteína MbdR-His<sub>6</sub>. Las sondas  $P_O$  y  $P_{B1}$  y los complejos MbdR- $P_O$  y MbdR- $P_{B1}$  se señalan con flechas a la izquierda y derecha de las imágenes, respectivamente.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la interacción existente entre el regulador MbdR y los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ , se llevaron a cabo ensayos de protección frente a la digestión por DNasa I (ensayos de *footprinting*). Para ello se emplearon las sondas  $P_O$  y  $P_{B1}$  así como la proteína MbdR purificada (MbdR-His<sub>6</sub>) (Fig. 29;  $P_O$  panel izquierdo, calles A a G;  $P_{B1}$ , panel derecho, calles A a F). La huella de protección frente a la digestión que se observó en el promotor  $P_O$  se extiende entre las bases +18 y -16 e implica también una banda de hipersensibilidad a la digestión en la posición -18. Por otro lado en el promotor  $P_{B1}$  se detecta una región de protección entre las posiciones -4 y -34 y una banda de hipersensibilidad a la digestión en la posición -37. Las zonas de protección engloban a las secuencias palindrómicas identificadas durante el análisis *in silico* de los promotores, y su posición es solapante con la caja -10 y la región que rodea al inicio de la transcripción (promotor  $P_O$ ) o con las cajas -10 y -35 (promotor  $P_{B1}$ ). Estas huellas de protección son compatibles con la hipótesis de que MbdR sea un represor de la transcripción que impida la correcta unión de la RNA polimerasa a los promotores.



Todos estos resultados corroboran la existencia de una interacción específica entre la proteína MbdR y los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .



**Figura 29. Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la proteína MbdR sobre los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .** En cada ensayo se ha empleado la sonda correspondiente ( $P_O$  para el estudio del promotor  $P_O$ , panel izquierdo;  $P_{B1}$  para el promotor  $P_{B1}$ , panel derecho). En las calles marcadas como A+G se han cargado las correspondientes reacciones de secuenciación de las sondas según el método de Maxam y Gilbert, llevadas a cabo tal y como se indica en el apartado 7.3 de *Materiales y Métodos*. Los números localizados sobre cada una de las calles indican la concentración (nM) de proteína MbdR-His<sub>6</sub> empleada para cada ensayo. Las calles marcadas con el signo “-” indican reacciones a las que no se les ha adicionado proteína MbdR. En las calles situadas más a la derecha de cada panel se ha añadido 3-metilbenzoyl-CoA (250  $\mu$ M). A la izquierda de cada panel se indica la secuencia del promotor, incluyendo las cajas -10/-35 y el punto de inicio de la transcripción (en verde). Las cajas azules señalan las secuencias palindrómicas conservadas detectadas en los promotores y las flechas azules la orientación de dichas cajas. El recuadro sombreado en naranja indica la secuencia protegida frente a la digestión por DNasa I. Las flechas naranjas indican regiones de hipersensibilidad frente a la digestión por DNasa I.

## 6.4. Identificación del inductor específico de la proteína MbdR

Los resultados presentados en los apartados anteriores demuestran que el represor transcripcional MbdR controla la expresión de los dos operones divergentes del *cluster mbd*. La identificación de la molécula que actúa como inductor específico del regulador transcripcional se planteó como el siguiente objetivo.

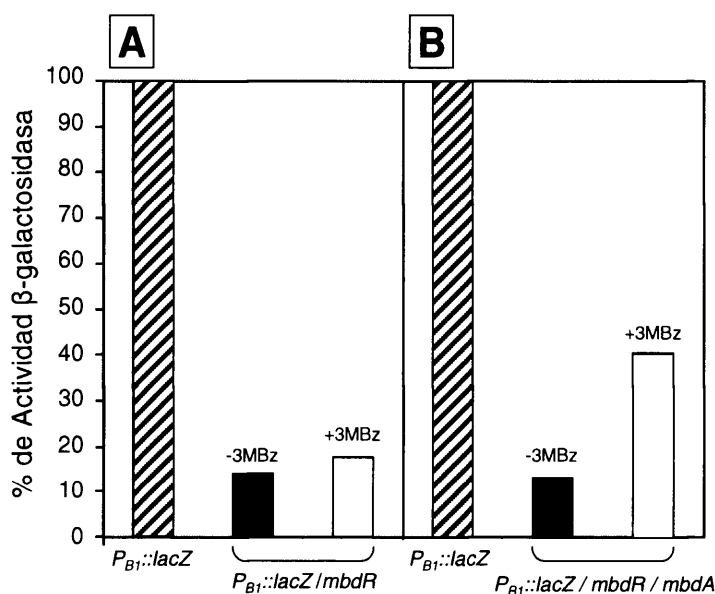
### 6.4.1. Estudio *in vivo* de la inducción del promotor $P_{B1}$ por 3-metilbenzoil-CoA

Como primer paso para la identificación del inductor de los genes catabólicos del *cluster mbd* se analizó la expresión de la fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  en una cepa hospedadora portadora del gen regulador *mbdR* e incapaz de metabolizar el 3MBz. Para ello se evaluó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en células de *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCKmbdR) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo con glicerol como fuente de carbono. Como se muestra en la Figura 30A, la presencia del gen *mbdR* reducía significativamente la actividad del promotor  $P_{B1}$ , confirmando su función como represor transcripcional. Por otro lado, la adición de 3MBz al medio de cultivo no alteraba significativamente la represión que el regulador MbdR ejercía sobre la fusión  $P_{B1}::lacZ$  (Fig. 30A), lo que suponía que el 3MBz, sustrato de la ruta *mbd*, no era capaz de actuar como inductor del promotor  $P_{B1}$ .

En una segunda aproximación se estudió si el intermediario central de la ruta *mbd*, el 3-metilbenzoil-CoA, producto de la activación del 3MBz y compuesto final que se genera en la ruta periférica de degradación de *m*-xileno, tenía actividad inductora sobre el sistema regulador MbdR- $P_{B1}$ . Para ello, se construyó la cepa *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCKmbdR, pUCmbdA) que porta la fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$ , expresa el regulador MbdR y además es capaz de producir 3-metilbenzoil-CoA en presencia de 3MBz por la acción de la 3MBz-CoA ligasa codificada por el gen *mbdA*.

Los cultivos anaeróbicos de la cepa *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCKmbdR, pUCmbdA) sólo mostraron una recuperación significativa en la expresión del promotor  $P_{B1}$  cuando se añadía 3MBz al medio de cultivo (Fig. 30B). Este resultado sugería que el 3-metilbenzoil-CoA formado a partir del 3MBz añadido al medio de cultivo de células de *E. coli* que expresan el gen *mbdA*, es el responsable de la activación (por cese de la represión) del promotor  $P_{B1}$ . El hecho de que no se restaure totalmente la actividad  $\beta$ -

galactosidasa observada en ausencia del gen regulador probablemente se deba a la dosis multicopia del gen *mbdR* en el sistema de estudio.

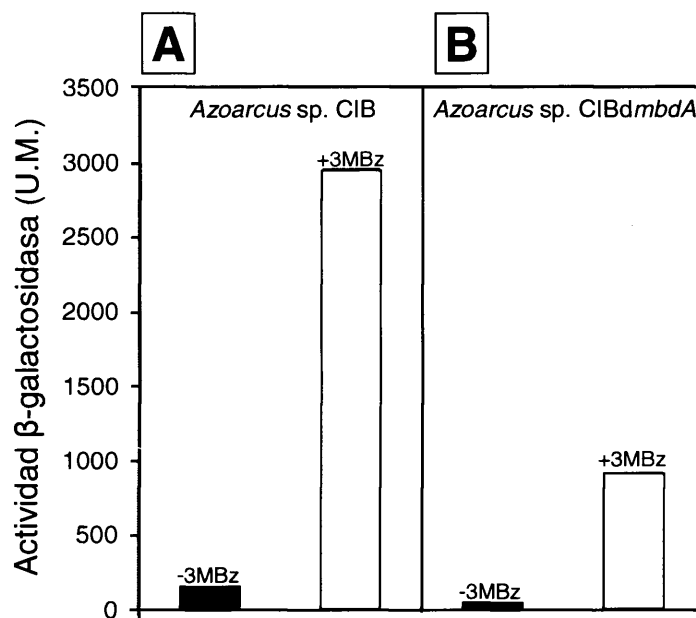


**Figura 30. Control de la fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  en *E. coli*.** Las células *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCKmbdR) (panel A) y *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCKmbdR, pUCmbdA) (panel B) y la cepa control *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>B1</sub>, pCK01) (paneles A y B), utilizadas en los ensayos de actividad β-galactosidasa, se obtuvieron a partir de cultivos anaeróbicos en medio mínimo M63 empleando glicerol 30 mM como fuente de carbono. La fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  se encuentra incluida en el plásmido pIZP<sub>B1</sub>. El gen regulador *mbdR* se expresa a partir del promotor *Plac* en la construcción pCKmbdR. La actividad 3MBz-CoA ligasa está codificada por el gen *mbdA*, que se expresa en la construcción pUCmbdA bajo el control del promotor *Plac*. Dado que el gen regulador *lacI<sup>q</sup>* está incluido en pIZP<sub>B1</sub>, se ha añadido IPTG 0.5 mM a los cultivos para permitir la expresión de los genes *mbdR* y *mbdA*. Las barras se corresponden con la actividad del promotor  $P_{B1}$  en ausencia de MbdR (rayado), en presencia de MbdR (negro), y en presencia de MbdR y 3MBz (blanco). Se representa el tanto por ciento de actividad beta-galactosidasa respecto al valor máximo obtenido (~4000 U. Miller). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes y presentaron una desviación estándar inferior al 10%.

El siguiente paso consistió en evaluar la actividad β-galactosidasa de la fusión  $P_{B1}::lacZ$  en una cepa mutante de *Azoarcus* sp. CIB que contiene el gen *mbdA* inactivo. Para ello se introdujo mediante electroporación la construcción pIZP<sub>B1</sub> en *Azoarcus* sp. CIB $mbdA$  (Tabla 3). Las cepas *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>B1</sub>) y *Azoarcus* sp. CIB $mbdA$  (pIZP<sub>B1</sub>) se cultivaron anaeróticamente en presencia o ausencia de 3MBz. En la Figura 31 se puede observar que en presencia de 3MBz (condiciones de inducción) la actividad β-galactosidasa de la cepa *Azoarcus* sp. CIB $mbdA$  (pIZP<sub>B1</sub>) es sensiblemente inferior a la observada en la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>B1</sub>). No obstante, a pesar de la inactivación el gen *mbdA* se sigue apreciando un nivel detectable de inducción del

promotor  $P_{B1}$ , que podría deberse a que estamos trabajando en un sistema en el que el promotor se encuentra en multicopia, a la expresión de otras enzimas de la célula con capacidad CoA ligasa que no permitirían la producción de suficiente 3-metilbenzoil-CoA como para crecer anaeróbicamente en 3MBz pero sí como para permitir la actividad de  $P_{B1}$  en el sistema de estudio, o a que la mutación del gen *mbdA* revierte en algunas células de la población y se regenera el gen *mbdA* activo.

Todos estos resultados sugieren que el 3-metilbenzoil-CoA es el inductor específico de la proteína MbdR que permite la expresión de los genes *mbd*.



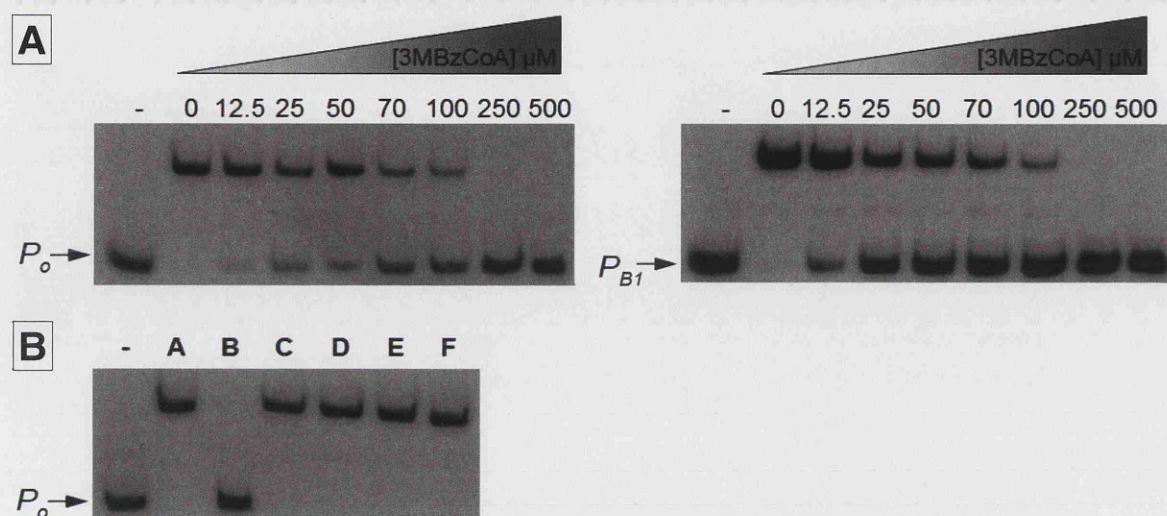
**Figura 31. Expresión de la fusión  $P_{B1}::lacZ$  en *Azoarcus sp. CIB* y *Azoarcus sp. CIBdmbdA*.** La figura muestra la actividad β-galactosidasa en las cepas *Azoarcus sp. CIB* (pIZP<sub>B1</sub>) (panel A) y *Azoarcus sp. CIBdmbdA* (pIZP<sub>B1</sub>) (panel B) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo MC complementado con ácido glutárico 7 mM y en presencia (barras blancas, +3MBz) o en ausencia (barras negras, -3MBz) de 3MBz 3 mM. La fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  se encuentra incluida en el plásmido pIZP<sub>B1</sub>. El gen *mbdA* se encuentra mutado en el cromosoma de *Azoarcus sp. CIBdmbdA* (Tabla 3). Los datos mostrados son el resultado de un experimento, los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes y presentaron una desviación estándar inferior al 10%.

#### 6.4.2. Estudio *in vitro* de la inducción de los promotores $P_O$ y $P_{B1}$ por 3-metilbenzoil-CoA

Con el objetivo de confirmar la identidad del inductor específico del *cluster mbd* se realizaron experimentos *in vitro* de interacción entre la proteína MbdR y los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  en presencia de 3-metilbenzoil-CoA.



Para evaluar la interacción existente entre la proteína MbdR purificada (MbdR-His<sub>6</sub>) y el inductor 3-metilbenzoil-CoA se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel con las sondas de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  (Fig. 32A). Se pudo observar que la formación de los complejos de retardo MbdR- $P_O$  y MbdR- $P_{B1}$  disminuye a medida que se incrementa la concentración de 3-metilbenzoil-CoA y dejan de observarse a una concentración de 3-metilbenzoil-CoA de 250  $\mu$ M ( $K_d \sim 55 \mu$ M para  $P_O$ ;  $K_d \sim 36 \mu$ M para  $P_{B1}$ ), lo que indica que existe una interacción entre el 3-metilbenzoil-CoA y el regulador MbdR que impide la unión de éste a los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .

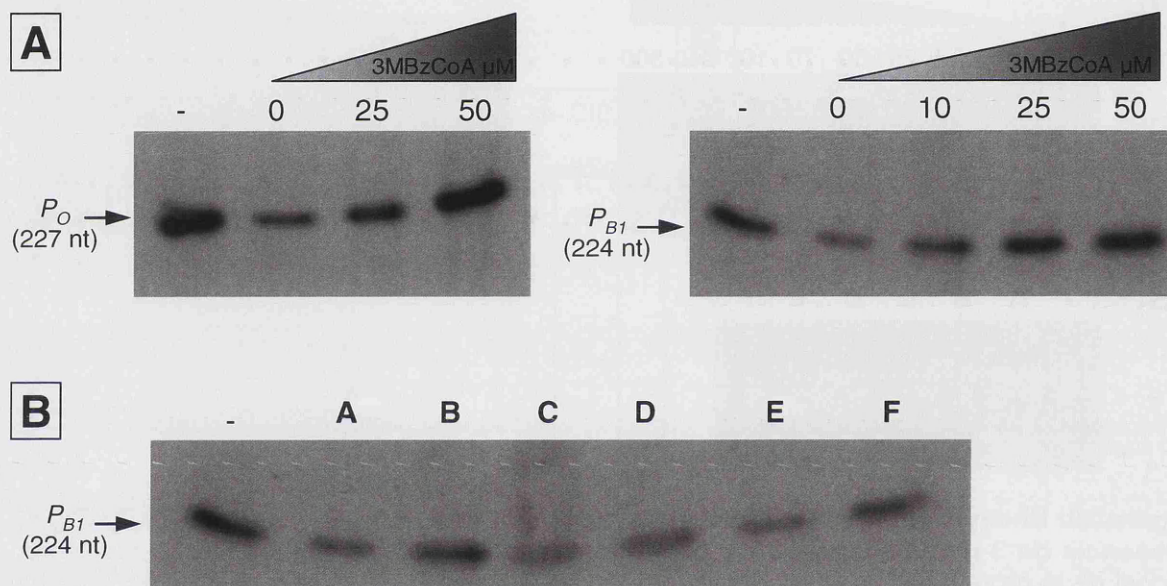


**Figura 32. Ensayo *in vitro* de unión de la proteína MbdR a los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  en presencia de 3-metilbenzoil-CoA y otros compuestos análogos. A)** Ensayos de retardo en gel de la proteína MbdR-His<sub>6</sub> purificada con las sondas  $P_O$  (panel izquierdo) y  $P_{B1}$  (panel derecho). Calles "-", sondas en ausencia de regulador. En el resto de calles se ha añadido proteína MbdR-His<sub>6</sub> a una concentración de 30 nM. Sobre cada calle se muestra la concentración (en  $\mu$ M) de 3-metilbenzoil-CoA que se ha adicionado. **B)** Ensayo de retardo en gel con la proteína MbdR-His<sub>6</sub> sobre la sonda  $P_O$  en presencia de diferentes compuestos aromáticos. Calle "-", sonda  $P_O$  en ausencia de proteína. En las calles A-F se adicionó proteína MbdR-His<sub>6</sub> (20 nM). Las calles B-F se complementaron con diferentes compuestos: B, 3-metilbenzoil-CoA 250  $\mu$ M; C, benzoil-CoA 2 mM; D, fenilacetil-CoA 2 mM; E, 3MBz 2 mM; F, 3MBz 2 mM + CoA 2 mM.

Para comprobar si la inducción por parte del 3-metilbenzoil-CoA sobre MbdR era específica o si, en cambio, podía ser ejercida por otros derivados CoA de compuestos aromáticos análogos, se analizó la formación del complejo MbdR- $P_O$  en ensayos de retardo en gel a los que se añadieron benzoil-CoA y fenilacetil-CoA (Fig. 32B). En estos ensayos se evidenció que ninguno de estos análogos (a concentraciones de 2 mM) era capaz de impedir la formación del complejo MbdR- $P_O$ . Por otro lado, ni el 3MBz ni el CoA por separado, o cuando ambos están presentes a la vez, son capaces de impedir la formación del complejo de retardo. Todos estos resultados demuestran la especificidad como inductor del 3-metilbenzoil-CoA.



Dado que mediante experimentos de protección frente a la digestión por DNasa I (ensayos de *footprinting*) se había identificado la región operadora de la proteína MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ , se procedió a reproducir dichos experimentos añadiendo 3-metilbenzoil-CoA (Fig. 29;  $P_O$  panel superior, calle H;  $P_{B1}$ , panel inferior, calle G). En estos ensayos se observó que la huella de protección debida a la proteína MbdR desaparecía en presencia de 3-metilbenzoil-CoA, recuperándose el patrón de digestión observado en las sondas control, lo que confirmaba la ausencia de interacción entre MbdR y los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  en presencia del inductor 3-metilbenzoil-CoA.



**Figura 33. Efecto *in vitro* de la proteína MbdR y el 3-metilbenzoil-CoA sobre la actividad de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ .** Se llevaron a cabo reacciones de transcripción *in vitro* en las que se utilizaron como molde los plásmidos pJCDP<sub>O</sub> y pJCDP<sub>B1</sub>, que contienen los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ , los cuales generan transcritos de 227 y 224 nt, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo adicionando RNA polimerasa de *E. coli* 30 nM, tal y como se indica en el apartado 7.4 de *Materiales y Métodos*. Las calles marcadas con el signo “-” son reacciones control a las que no se ha adicionado proteína MbdR. Al resto de las reacciones se les ha añadido MbdR-His<sub>6</sub> 100 nM. **A)** Efecto de concentraciones crecientes de 3-metilbenzoil-CoA sobre la represión de la transcripción ejercida por MbdR sobre  $P_O$  (panel izquierdo) y  $P_{B1}$  (panel derecho). Sobre cada calle se indica la concentración añadida de inductor (en  $\mu$ M). **B)** Efecto de diferentes compuestos sobre la represión de la transcripción ejercida por MbdR sobre  $P_{B1}$ : A, sin efector; B, 3-metilbenzoil-CoA 10  $\mu$ M; C, 3MBz 1 mM + CoA 1 mM; D, benzoil-CoA 1 mM; E, fenilacetil-CoA 1 mM; F, CoA 1 mM.

Con el fin de complementar el estudio de la represión ejercida por MbdR sobre los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ , así como el efecto inductor del 3-metilbenzoil-CoA, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro*. Para ello, se emplearon la proteína MbdR purificada (MbdR-His<sub>6</sub>), RNA polimerasa de *E. coli* y, como DNA molde para la



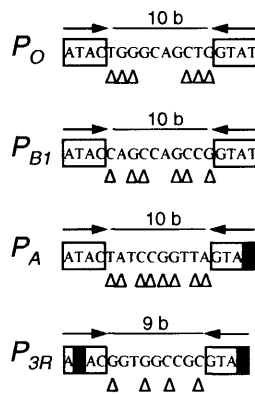
transcripción, las construcciones pJCDP<sub>O</sub> y pJCDP<sub>B1</sub>, que contienen los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ , respectivamente, clonados como fragmentos *EcoRI/ScaI* en el vector pJCD (Tabla 4). En la Figura 33A se puede observar que la cantidad de transcrito del tamaño esperado que se genera a partir de  $P_O$  y  $P_{B1}$  disminuye tras la adición de MbdR, y que al añadir concentraciones crecientes de 3-metilbenzoil-CoA a la mezcla de reacción, la actividad de los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  se recupera. Estos resultados revelan que es posible observar *in vitro* el efecto inductor del 3-metilbenzoil-CoA sobre la acción represora de MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ . Además, se comprobó que la adición de otros compuestos, como benzoil-CoA, fenilacetil-CoA, 3MBz y CoA, en la reacción de transcripción *in vitro* no implicaba un efecto inductor similar al detectado al añadir 3-metilbenzoil-CoA, confirmando la especificidad de dicha inducción (Fig. 33B).

## 7. Estudio de los promotores que controlan los elementos reguladores en el *cluster mbd*

### 7.1. Identificación y clonación de los promotores $P_A$ y $P_{3R}$

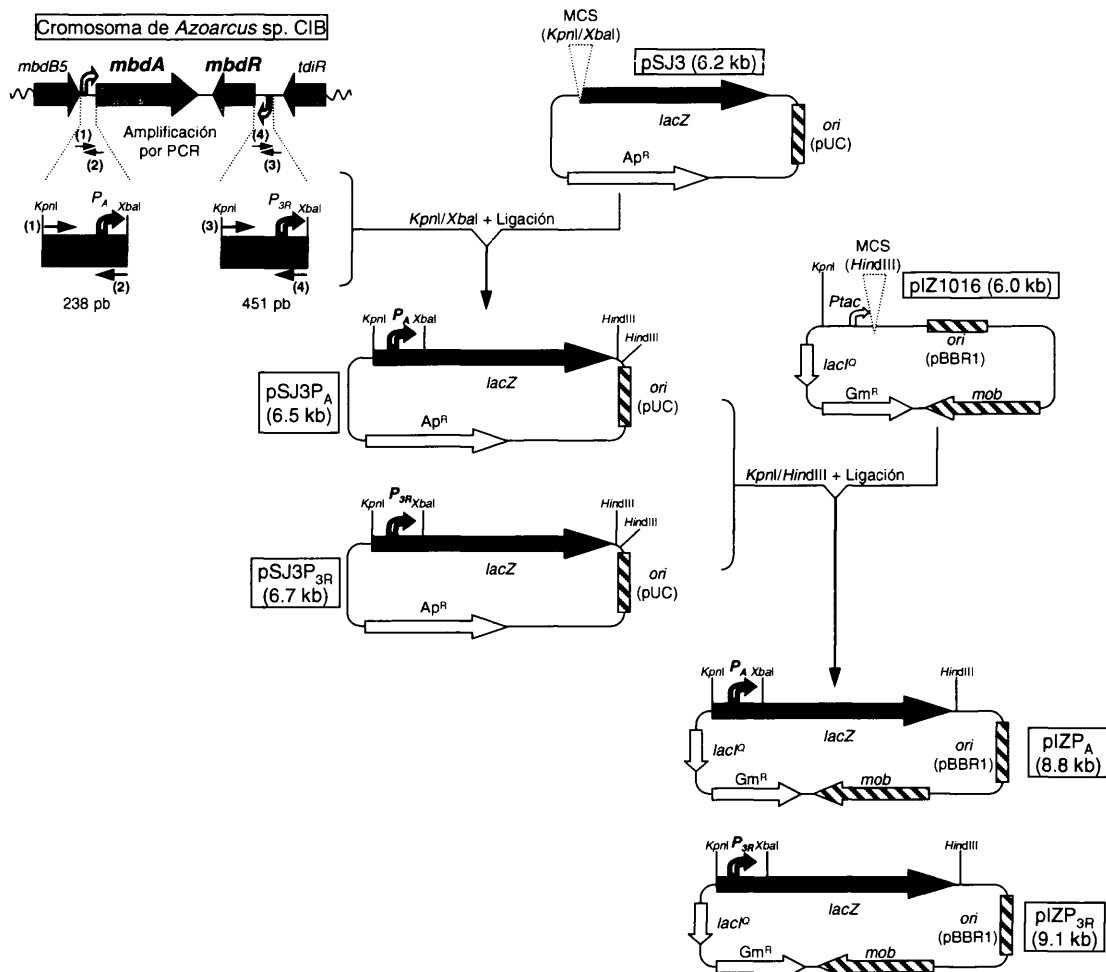
Los resultados reflejados en los apartados anteriores permitieron caracterizar la regulación de los promotores divergentes  $P_O$  y  $P_{B1}$ . En este sistema regulador, la proteína MbdR y el inductor 3-metilbenzoil-CoA poseen un papel fundamental. Dado que el gen *mbdR* no está controlado por ninguno de los promotores divergentes  $P_O$  y  $P_{B1}$ , se procedió a identificar su propio promotor ( $P_{3R}$ ). Por otro lado, el inductor 3-metilbenzoil-CoA es producido a partir de 3MBz por el producto del gen *mbdA*. Aunque el gen *mbdA* se localiza al final del operón controlado por el promotor  $P_{B1}$ , el espacio intergénico existente entre los genes *mbdB5* y *mbdA* (231 pb, Tabla 6) podría albergar un promotor adicional específico para el gen *mbdA*, que controlaría los niveles de 3-metilbenzoil-CoA necesarios para inducir la expresión de los genes del *cluster mbd*. Al posible promotor adicional del gen *mbdA* se le denominó  $P_A$ .

Cuando se realizó un análisis de la secuencia de nucleótidos de la región intergénica *mbdB5-mbdA* y del promotor  $P_{3R}$  se observó la presencia de sendos pares de secuencias palindrómicas similares a las reconocidas por la proteína MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  (Fig. 34), lo que sugería la inclusión de los hipotéticos promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$  en el circuito regulador controlado por MbdR.



**Figura 34. Comparativa de las cajas operadoras de MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  con secuencias palindrómicas similares detectadas en los promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$ .** Las cajas palindrómicas aparecen recuadradas en azul y su orientación señalada por una flecha del mismo color. Los nucleótidos no conservados en las cajas de los promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$  se muestran sombreados en azul. Los nucleótidos que extienden las cajas palindrómicas en cada uno de los promotores se señalan con triángulos rojos.

Las regiones intergénicas *mbdB5-mbdA* y *tdiR-mbdR* se amplificaron por PCR incluyendo los codones de inicio de los genes *mbdA* y *mbdR*, y se clonaron en el vector de búsqueda de promotores pSJ3, dando lugar a las construcciones pSJ3P<sub>A</sub> ( $P_A::lacZ$ ) y pSJ3P<sub>3R</sub> ( $P_{3R}::lacZ$ ), respectivamente (Tabla 4). Dado que el vector pSJ3 no es capaz de replicar en *Azotarcus* sp. CIB, se procedió a subclonar las fusiones traduccionales  $P_A::lacZ$  y  $P_{3R}::lacZ$  en el plásmido de amplio rango de hospedador pIZ1016, de forma que el promotor *Ptac* de dicho plásmido es deletado y sustituido por la fusión traduccional. En la Figura 35 se esquematiza la estrategia seguida para la construcción de los plásmidos pSJ3P<sub>A</sub>, pSJ3P<sub>3R</sub>, pIZP<sub>A</sub> y pIZP<sub>3R</sub>.



**Figura 35** (página anterior). **Esquema de la estrategia empleada para la construcción de las fusiones traduccionales  $P_A::lacZ$  y  $P_{3R}::lacZ$ .** Las regiones intergénicas *mbdB5-mbdA* y *tdiR-mbdR* se amplificaron mediante PCR. Los oligonucleótidos empleados fueron: (1) Intergénica *mbdB5-mbdA* *KpnI* 5', (2) Intergénica *mbdB5-mbdA* *XbaI* 3'.2, (3) *PmbdR* *KpnI* 5' y (4) *PmbdR* *XbaI* 3'. Estos cebadores introducen dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* en los extremos 5' y 3' del fragmento amplificado, de tal forma que la diana *XbaI* de ambos fragmentos permite generar una fusión traduccional de los primeros 3 nt de los genes estructurales *mbdA* y *mbdR* con el gen testigo *lacZ* en el vector de búsqueda de promotores pSJ3. Las fusiones traduccionales se subclonaron como fragmentos *KpnI-HindIII* de aproximadamente 3.3 kb ( $P_A::lacZ$ ) y 3.5 kb ( $P_{3R}::lacZ$ ) en el vector de amplio rango de hospedador pIZ1016.

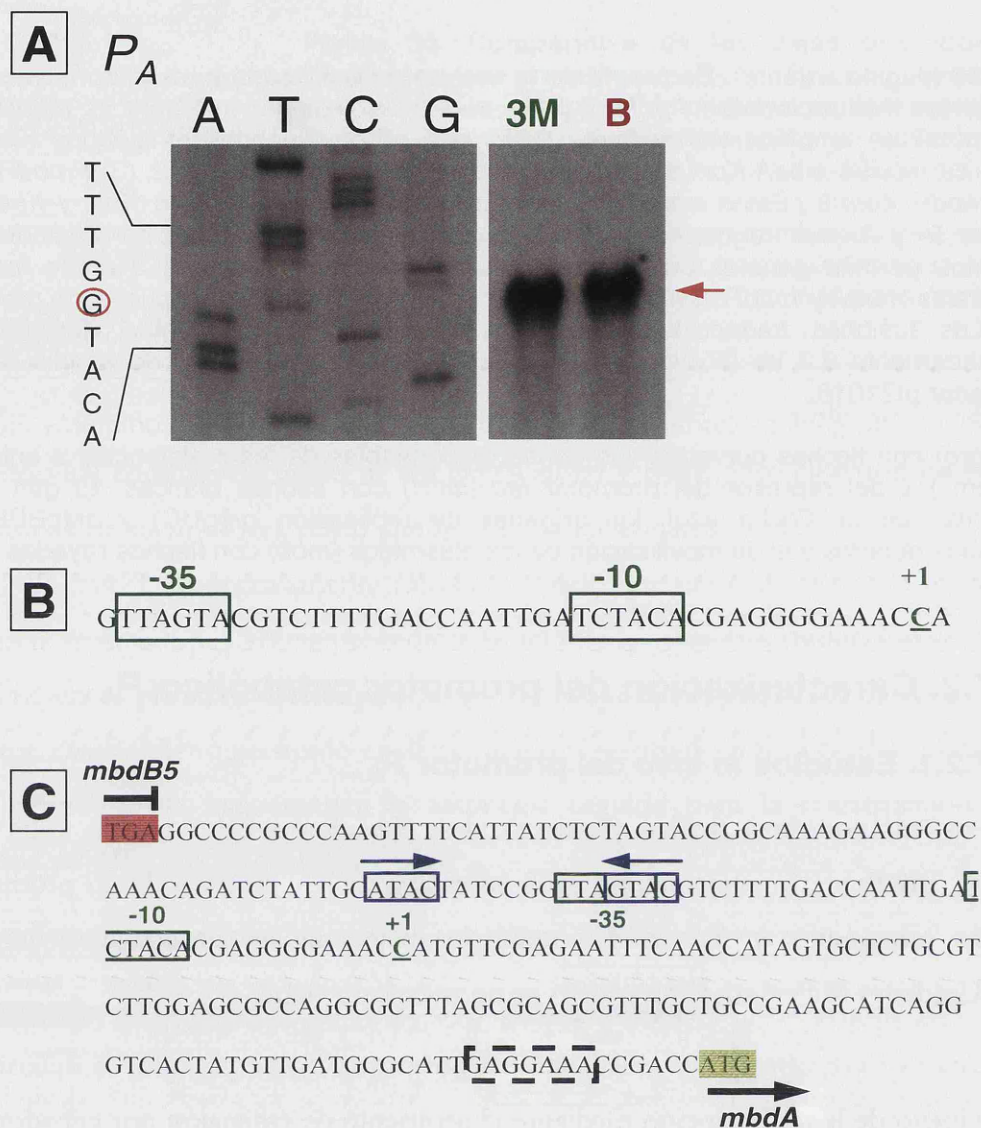
Las regiones intergénicas clonadas se representan en color gris, los promotores  $P_A$  (rojo) y  $P_{3R}$  (negro) con flechas curvadas, los genes responsables de las resistencias a antibióticos ( $Ap^R$ ,  $Gm^R$ ) y del represor del promotor *lac* (*lacI<sup>Q</sup>*) con flechas blancas. El gen *lacZ* se representa con un flecha azul, los orígenes de replicación *ori*(pUC) y *ori*(pBBR1) con rectángulos rayados y el de movilización de los plásmidos (*mob*) con flechas rayadas.

## 7.2. Caracterización del promotor catabólico $P_A$

### 7.2.1. Estudios *in vivo* del promotor $P_A$

Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa llevados a cabo con la cepa *E. coli* MC4100 (pIZP<sub>A</sub>) en medio mínimo M63 confirmaron la existencia de un promotor en la región intergénica *mbdB5-mbdA*, aunque los bajos niveles de actividad detectados (~150 Unidades Miller) sugieren que  $P_A$  es un promotor débil.

Una vez corroborada la existencia del promotor  $P_A$ , se procedió a determinar el sitio de inicio de la transcripción mediante el protocolo de extensión por cebador (*primer extension*). Para ello se extrajo RNA de células de *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>A</sub>) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo complementado con benzoato o con 3MBz como únicas fuentes de carbono. La identificación del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 36A) permitió proponer las cajas de interacción con la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa (ver Fig. 36B). Las secuencias -10 y -35 del promotor  $P_A$  están separadas entre sí por 18 nt y difieren en tres nucleótidos de las secuencias consenso TATAAT (-10) y TTGACA (-35) (Dombroski, 1997). En la Figura 36C se puede observar un esquema de la región intergénica *mbdB5-mbdA* en la que se detalla la posible región operadora para el reconocimiento de MbdR y otros elementos reguladores del promotor  $P_A$ .



**Figura 36. A) Determinación del punto de inicio de la transcripción en el promotor  $P_A$ .** El RNA total se extrajo a partir de células de *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>A</sub>) cultivadas anaeróticamente en medio MC con 3MBz (3 mM) o benzoato (3 mM) como únicas fuentes de carbono. El tamaño de los productos de la extensión se determinó por comparación con el patrón de secuenciación del promotor  $P_A$  (calles A, T, C, G). Las calles marcadas como **3M** y **B** muestran los productos de extensión a partir de los cultivos en los que se empleó 3MBz o benzoato como fuente de carbono, respectivamente. La banda correspondiente al producto de extensión aparece señalada con una flecha naranja. Tanto para realizar la reacción de extensión como para la reacción de secuenciación se empleó el oligonucleótido *PmbdA* *EcoRI* 3' (Tabla 5). A la izquierda de la imagen se muestra la secuencia de la región en la que se encuentra el punto de inicio de la transcripción (círculo naranja). La secuencia mostrada se corresponde con la hebra no codificante.

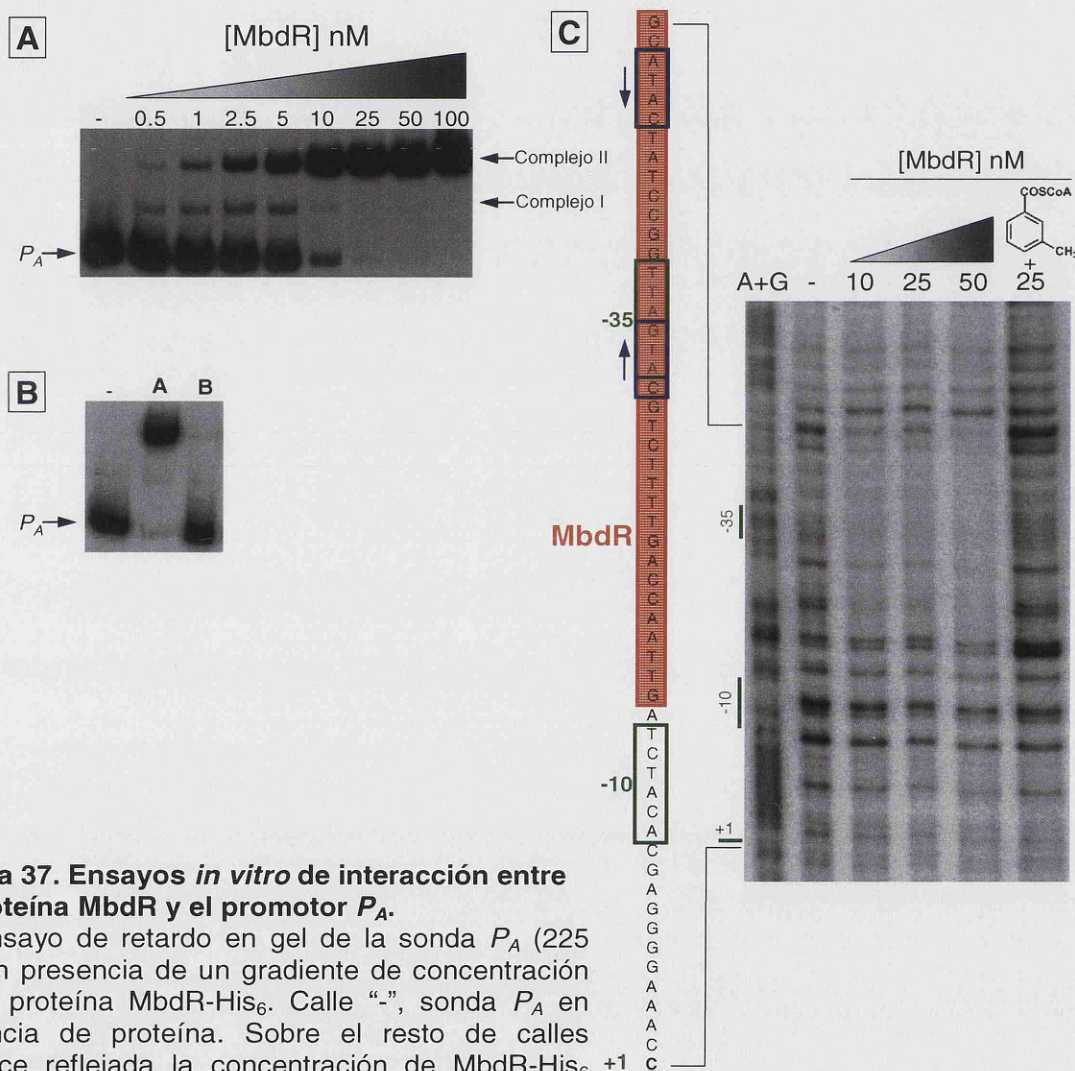
**B) Secuencia de la región -10/-35 y del inicio de la transcripción en el promotor  $P_A$ .** Las cajas -10 y -35 del promotor  $P_A$  aparecen recuadradas en verde. El sitio de inicio de la transcripción (+1) se detalla subrayado en verde en la hebra codificante.

**C) Secuencia de la región promotora  $P_A$ .** Se mantiene el código de colores del panel B) para las cajas -10/-35 y el punto de inicio de la transcripción. El codón de inicio del gen *mbdA* aparece señalado en verde claro, y la secuencia RBS reconocida por los ribosomas se ha recuadrado con una línea negra discontinua. El codón stop del gen *mbdB5* aparece sombreado en rojo. Las cajas palindrómicas presuntamente reconocidas por la proteína MbdR se muestran recuadradas en azul y su orientación señalada por flechas del mismo color.



### 7.2.2. Estudio *in vitro* de la interacción entre MbdR y $P_A$

Con el objetivo de profundizar en la posible regulación del promotor  $P_A$  por parte de MbdR se realizaron experimentos de interacción proteína-DNA *in vitro*. Mediante experimentos de retardo en gel se observó la formación de complejos de retardo MbdR- $P_A$  en condiciones similares a las observadas para  $P_O$  y  $P_{BI}$  (Fig. 37A). Así, la sonda  $P_A$  se retarda en presencia de MbdR a una concentración de  $\sim 25$  nM ( $K_d \sim 5.9$  nM) (Fig. 37A) y no se forma el complejo de retardo cuando a la mezcla de reacción se añade 3-metilbenzoil-CoA (Fig. 37B).



**Figura 37. Ensayos *in vitro* de interacción entre la proteína MbdR y el promotor  $P_A$ .**

**A)** Ensayo de retardo en gel de la sonda  $P_A$  (225 pb) en presencia de un gradiente de concentración de la proteína MbdR-His<sub>6</sub>. Calle "-", sonda  $P_A$  en ausencia de proteína. Sobre el resto de calles aparece reflejada la concentración de MbdR-His<sub>6</sub> (en nM) empleada en cada reacción de retardo.

**B)** Ensayo de retardo en gel en el que se muestra el efecto que tiene la adición de 3-metilbenzoil-CoA sobre la formación del complejo MbdR- $P_A$ . Calle "-", sonda  $P_A$  a la que no se le ha añadido MbdR-His<sub>6</sub> purificada. Calles A y B, reacciones de retardo en las que se añadió MbdR-His<sub>6</sub> a una concentración de 25 nM. En la reacción de retardo de la calle B se añadió además 3-metilbenzoil-CoA 250  $\mu$ M. (Continúa en la página siguiente).

**Figura 37** (continuación). **C)** Ensayo de protección frente a la digestión por DNasa I de la interacción de la proteína MbdR con el promotor  $P_A$ . En la calle marcada como A+G se ha cargado la reacción de secuenciación de la sonda según el método de Maxam y Gilbert, llevada a cabo tal y como se indica en el apartado 7.3 de *Materiales y Métodos*. Los números localizados sobre cada una de las calles indican la concentración (nM) de proteína MbdR-His<sub>6</sub> empleada para cada ensayo. La calle marcada con el signo “-” indica una reacción a la que no se les ha adicionado proteína MbdR. En la calle situada más a la derecha del panel se ha añadido 3-metilbenzoil-CoA 250  $\mu$ M. A la izquierda del panel se indica la secuencia del promotor, incluyendo las cajas -10/-35 y el punto de inicio de la transcripción (señalados en color verde). Las cajas azules señalan las secuencias palindrómicas de interacción con MbdR detectadas en los promotores y las flechas azules la orientación de dichas cajas. El recuadro sombreado en naranja indica la región protegida por MbdR frente a la digestión por DNasa I. Las sondas  $P_O$  y  $P_{B1}$  y los complejos MbdR- $P_O$  y MbdR- $P_{B1}$  se señalan con flechas a la izquierda y derecha de las imágenes, respectivamente.

La realización de experimentos de protección frente a la digestión por DNasa I corroboraron los resultados observados en los experimentos de retardo en gel. (Fig. 37C). La proteína MbdR genera una huella específica de protección frente a la digestión en el promotor  $P_A$ . Dentro de la zona protegida se encuentran las cajas operadoras de MbdR postuladas tras el análisis de la secuencia del promotor. Además, se observó la recuperación del patrón de digestión en las zonas protegidas por MbdR al añadir 3-metilbenzoil-CoA a las mezclas de reacción (Fig. 37C), lo que indica la ausencia de interacción entre MbdR y  $P_A$  en presencia del inductor 3-metilbenzoil-CoA.

Todos estos resultados del análisis *in vitro* sugieren que el promotor  $P_A$  está controlado por el represor MbdR, y que el 3-metilbenzoil-CoA es la molécula que impide la formación del complejo MbdR- $P_A$ .

### 7.2.3. Papel de los promotores $P_{B1}$ y $P_A$ en la expresión del gen *mbdA* en *Azoarcus* sp. CIB

Los resultados mostrados en los apartados anteriores indican que el gen *mbdA* se transcribe a partir de los promotores  $P_{B1}$  y  $P_A$  en el catabolismo anaeróbico de 3MBz. Para comprobar si *Azoarcus* sp. CIB era capaz de crecer anaeróbicamente en 3MBz cuando la transcripción a partir del promotor  $P_{B1}$  se encuentra interrumpida, se procedió a la construcción de un mutante por inserción en el gen *mbdB1*. Para ello se siguió el esquema representado en la Figura 12. Se amplificó mediante PCR un fragmento interno del gen *mbdB1* (728 pb) con los oligonucleótidos *mbdB1*mut *Eco*RI 5' y *mbdB1*mut *Xba*I 3', que se clonó en el vector pK18*mob*. El plásmido resultante, pK18*mbdB1* (Tabla 4), se introdujo en *Azoarcus* sp. CIB mediante conjugación biparental, de tal forma que mediante recombinación homóloga se generó la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*mbdB1* (Tabla 3). Esta cepa se mostró incapaz de crecer anaeróbicamente en medio mínimo

empleando 3MBz como única fuente de carbono, pero en cambio era capaz de crecer empleando *m*-xileno, un compuesto que genera directamente 3-metilbenzoil-CoA en su degradación. Para dilucidar si el fenotipo observado se debía a un efecto sobre la expresión del gen *mbdA*, cuyo producto proteico es imprescindible para la activación del 3MBz, o si por el contrario se debía a la inactivación del presunto sistema transportador de 3MBz codificado por los genes *mbdB1-B5*, se complementó la cepa mutante con el plásmido pIZmbdA que expresa eficientemente el gen *mbdA* desde un promotor heterólogo (Tabla 4; Fig. 13). Dado que la cepa *Azoarcus* sp. CIBd*mbdB1* (pIZmbdA) recuperó la capacidad de crecimiento anaeróbico en medio mínimo empleando 3MBz 3 mM como única fuente de carbono, se pudo descartar que el transportador de tipo ABC codificado por los genes *mbdB1-B5* fuera estrictamente necesario para el catabolismo anaeróbico del 3MBz (a las concentraciones empleadas para el crecimiento en el laboratorio), y se puso en evidencia la importancia del promotor  $P_{B1}$  para una eficiente expresión del gen *mbdA*.

### 7.3. Caracterización del promotor $P_{3R}$ que regula la expresión del gen *mbdR*

#### 7.3.1. Estudios *in vivo* del promotor $P_{3R}$

Como hemos comentado al inicio de este apartado, la región situada en posición 5' del gen *mbdR* se clonó como una fusión traduccional con el gen testigo *lacZ*, lo que dio lugar a la construcción pIZP<sub>3R</sub> (Fig. 35). Para confirmar la existencia del promotor  $P_{3R}$  en la región clonada se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa con células de *E. coli* DH10B (pIZP<sub>3R</sub>), en los que se observó una baja actividad promotora (~75 Unidades Miller).

Para determinar el punto de inicio de la transcripción controlada por el promotor  $P_{3R}$  mediante el protocolo de extensión por cebador (*primer extension*), se procedió a extraer RNA total a partir de células de *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>3R</sub>) cultivadas anaeróbicamente en medio mínimo complementado con benzoato o con 3MBz como únicas fuentes de carbono.

La identificación del sitio de inicio de la transcripción, que se encuentra situado a 120 pb del codón de inicio del gen *mbdR* (Fig. 38A), permitió proponer las cajas de interacción con la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa (Fig. 38B). La región -35 del promotor  $P_{3R}$  difiere en dos bases de la secuencia consenso TTGACA, mientras que la

región -10 no muestra ninguna coincidencia con la secuencia consenso TATAAT (Dombroski, 1997). En la Figura 38C se puede observar un esquema de la región intergénica *tdiR-mbdR* en la que se detallan las presuntas cajas operadoras para el reconocimiento por parte de MbdR en el promotor  $P_{JR}$ . A pesar de que en un primer momento sólo se había identificado la región operadora más conservada situada entre las cajas -10 y -35 (Fig. 34), un análisis exhaustivo de la región más alejada del punto de inicio de la transcripción reveló la presencia de posibles secuencias operadoras adicionales, si bien menos conservadas, para la unión de MbdR.

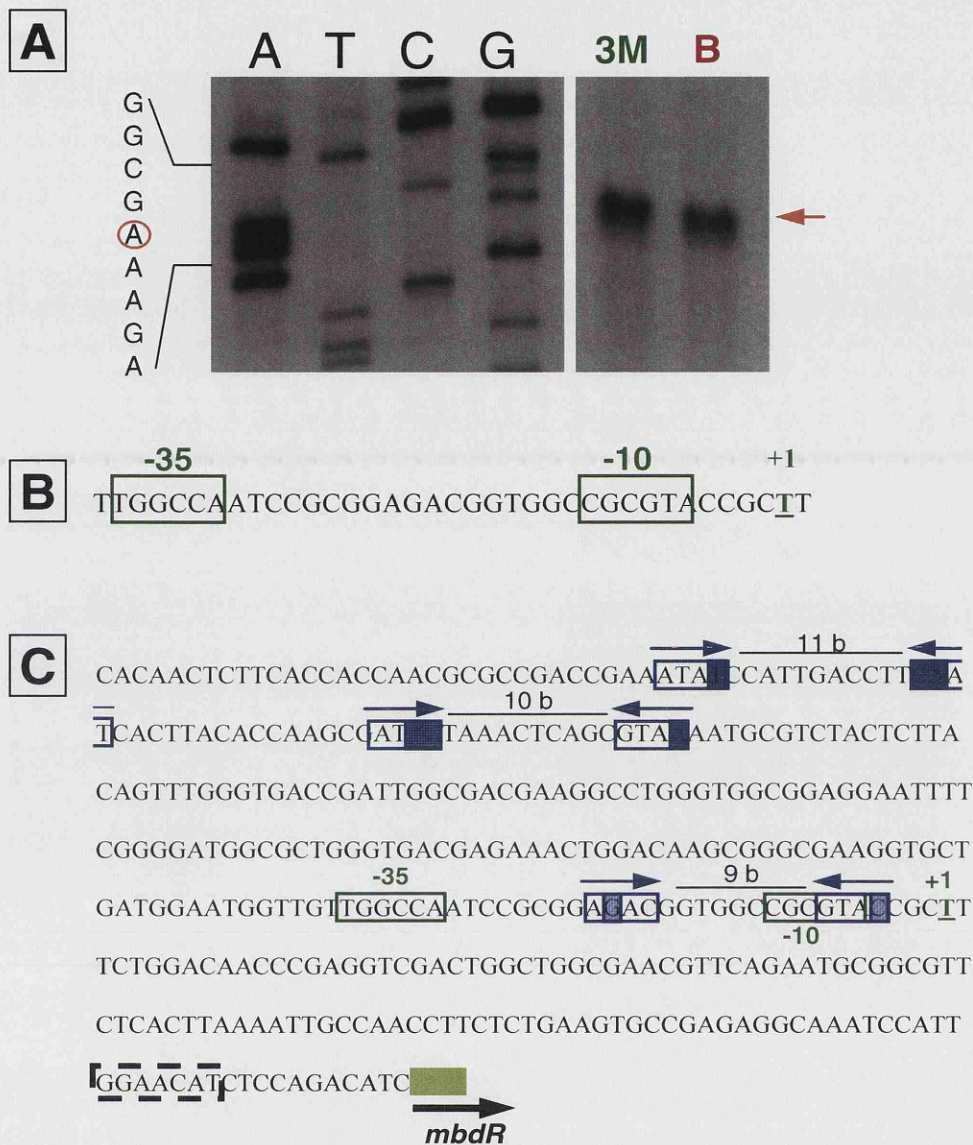
En los experimentos de extensión por cebador realizados a partir de células cultivadas tanto en benzoato como en 3MBz se observa formación del transcrito *mbdR*, si bien éste es ligeramente más abundante en 3MBz (Fig. 38), lo que sugiere el carácter eminentemente constitutivo del promotor  $P_{JR}$ , como ya se había observado en *Azorarcus* sp. CIB en los experimentos de expresión del gen *mbdR* mediante RT-PCR (Fig. 18).

### 7.3.2. Estudio *in vitro* de la interacción entre MbdR y $P_{JR}$

A pesar de que los resultados reflejados en los apartados anteriores parecían indicar que la actividad del promotor  $P_{JR}$  era fundamentalmente constitutiva bajo las condiciones de estudio, la existencia de hipotéticas secuencias operadoras para MbdR en  $P_{JR}$  (Fig. 38C) nos hizo plantearnos si podríamos detectar *in vitro* una interacción entre MbdR y el promotor, que podría dar cuenta de la ligera activación de éste en presencia de 3MBz (Fig. 38A). El hecho de que la hipotética secuencia operadora para MbdR más conservada, la solapante con la caja -10, presentara sustituciones de algunos nucleótidos conservados en las cajas consenso (Fig. 38C) podría indicar una interacción más débil entre MbdR y  $P_{JR}$  que la observada con los otros promotores del *cluster mbd*.

Mediante ensayos de retardo en gel con la sonda  $P_{JR}$  y la proteína MbdR purificada (MbdR-His<sub>6</sub>), se observó la formación de múltiples complejos de retardo cuya masa molecular aumentaba conforme lo hacía la concentración de proteína MbdR empleada en el ensayo (Fig. 39A). La concentración de proteína MbdR necesaria para que toda la sonda viera retardada su migración electroforética era de  $\sim 1 \mu\text{M}$ , significativamente superior a la observada para los otros promotores del *cluster mbd* ( $P_O$ ,  $\sim 5 \text{ nM}$ ;  $P_{BI}$ ,  $\sim 25 \text{ nM}$ ;  $P_{AB}$ ,  $\sim 25 \text{ nM}$ ). Por otro lado, se observó una significativa reducción en la formación de los complejos de retardo cuando a la mezcla de reacción se añadía 3-metilbenzoil-CoA (Fig. 39B), lo que sugiere que esta molécula impide la interacción entre MbdR y  $P_{JR}$ .





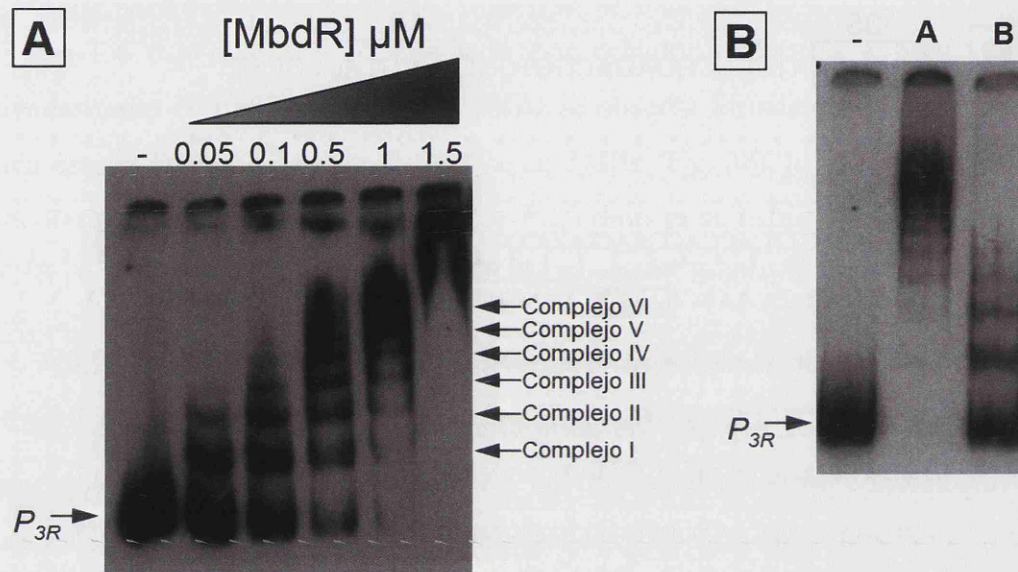
**Figura 38. A) Determinación del punto de inicio de la transcripción en el promotor  $P_{3R}$ .** El RNA total se extrajo a partir de células de *Azoarcus* sp. CIB (pIZP $_{3R}$ ) cultivadas anaeróbicamente en medio MC con 3MBz (3 mM) o benzoato (3 mM) como únicas fuentes de carbono. El tamaño de los productos de la extensión se determinó por comparación con el patrón de secuenciación del promotor  $P_{3R}$  (calles A, T, C, G). Las calles marcadas como **3M** y **B** muestran los productos de extensión a partir de los cultivos en los que se empleó 3MBz o benzoato como fuente de carbono. La banda correspondiente al producto de extensión aparece señalada con una flecha naranja. Tanto para realizar la reacción de extensión como para la reacción de secuenciación del promotor  $P_{3R}$  se empleó el oligonucleótido *PmbdR* *EcoRI* 3', cuya secuencia se detalla en la Tabla 5. A la izquierda de la imagen se muestra la secuencia de la región en la que se encuentra el punto de inicio de la transcripción (círculo naranja). La secuencia mostrada se corresponde con la hebra no codificante.

**B) Secuencia de la región -10/-35 y del inicio de la transcripción en el promotor  $P_{3R}$ .** Las cajas -10 y -35 del promotor aparecen recuadradas en verde. El sitio de inicio de la transcripción (+1) se detalla subrayado en verde en la hebra codificante.

**C) Secuencia de la región 5' del gen *mbdR*.** Se mantiene el código de colores del panel B) para las cajas -10/-35 y el punto de inicio de la transcripción. El codón de inicio del gen *mbdR* aparece señalado en verde claro y la secuencia RBS reconocida por los ribosomas se ha recuadrado con una línea negra discontinua. Las cajas palindrómicas presuntamente reconocidas por la proteína MbdR se muestran recuadradas en azul, su orientación señalada por flechas del mismo color y la distancia que las separa se indica con una barra negra y se detalla su longitud en bases (b). Las bases que difieren de la secuencia consenso para la región operadora de MbdR en los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  aparecen sombreadas en azul.



La detección de múltiples complejos de retardo MbdR- $P_{3R}$  (Fig. 39) está de acuerdo con la existencia de distintas regiones operadoras para MbdR e el promotor  $P_{3R}$  (Fig. 38C). Las tres regiones operadoras predichas difieren entre sí y de la secuencia consenso deducida para MbdR en  $P_O$  y  $P_{BI}$  (ATAC-10 pb-GTAT). Estas diferencias podrían ser la causa de la diferente afinidad del regulador por cada una de estas regiones operadoras, lo que daría cuenta de la formación de diferentes complejos de retardo según la concentración de proteína MbdR utilizada.



**Figura 39. Ensayos *in vitro* de interacción entre la proteína MbdR y el promotor  $P_{3R}$ .** **A)** Ensayo de retardo en gel de la sonda  $P_{3R}$  (352 pb) en presencia de un gradiente de concentración de la proteína MbdR-His<sub>6</sub>. Las diferentes calles aparecen rotuladas con la concentración (μM) de proteína MbdR-His<sub>6</sub> purificada que se ha añadido a cada una de ellas, salvo la marcada con un signo "-", a la que no se le ha añadido proteína. La sonda  $P_{3R}$  y los diferentes complejos MbdR- $P_{3R}$  se marcan con flechas negras. **B)** Ensayo de retardo en gel en el que se muestra el efecto que tiene la adición de 3-metilbenzoil-CoA sobre la formación de los complejos MbdR- $P_{3R}$ . Calle "-", sonda  $P_{3R}$  a la que no se le ha añadido MbdR-His<sub>6</sub> purificada. Calles A y B, reacciones de retardo a las que se les añadió MbdR-His<sub>6</sub> a una concentración de 0.5 μM. En la reacción de retardo de la calle B se añadió además 3-metilbenzoil-CoA 250 μM.

## 8. Estudio de la regulación sobreimpuesta en el *cluster mbd*

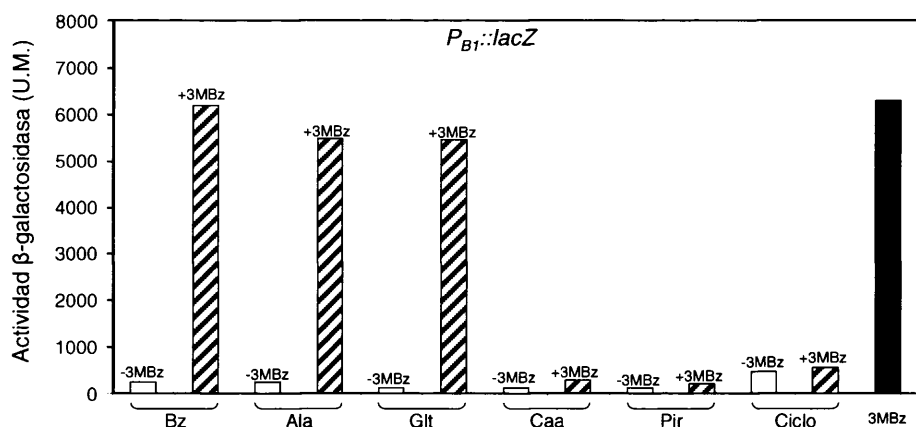
En la bibliografía científica aparecen ejemplos de bacterias anaerobias facultativas que poseen *clusters* génicos que además de mostrar una regulación transcripcional específica están sujetos a un nivel de regulación superior mediado por reguladores generales del metabolismo bacteriano (para revisión ver Carmona *et al.*, 2009). Entre las múltiples señales que influyen sobre el metabolismo bacteriano a través de reguladores globales destacan la presencia/ausencia de oxígeno y la represión por catabolito

(apartado 2.2 de *Introducción*). Entre los reguladores frecuentemente relacionados con frecuencia con la modulación de este tipo de procesos se encuentran los de la familia Fnr/Crp (Green *et al.*, 2001), alguno de cuyos miembros ya ha sido identificado en *Azoarcus* sp CIB (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006).

## 8.1. Análisis de la represión catabólica sobre los promotores $P_{B1}$ y $P_{3R}$

Una vez establecida la regulación específica del *cluster mbd* a través del sistema MbdR/3-metilbenzoil-CoA, se planteó detectar la existencia de una posible represión catabólica sobre la expresión de los genes *mbd* por parte de fuentes de carbono preferentes.

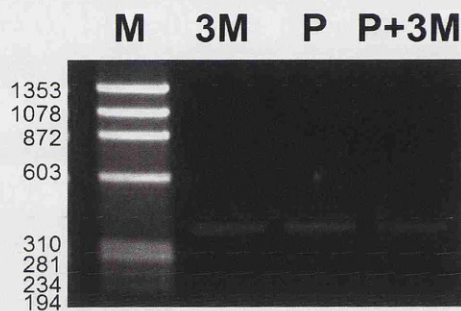
Para tratar de determinar la existencia de represión catabólica sobre los genes *mbd*, se monitorizó la expresión de la fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>B1</sub>), cultivada anaeróticamente en medio mínimo complementado con 3MBz más otros compuestos metabolizables por la bacteria. Compuestos como el piruvato, el ciclohexanocarboxilato y las mezclas que contienen todos los aminoácidos (casaminoácidos), ejercen represión catabólica. Por otro lado, el benzoato, la alanina y el ácido glutámico no ejercen una represión catabólica tan patente sobre la actividad del promotor  $P_{B1}$  (Fig. 40).



**Figura 40. Expresión de la fusión  $P_{B1}::lacZ$  en *Azoarcus* sp. CIB cultivado en diferentes fuentes de carbono.** La figura muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa *Azoarcus* sp. CIB (pIZP<sub>B1</sub>) cultivada anaeróticamente en medio mínimo MC complementado con diferentes fuentes de carbono: **Bz**, benzoato 3mM; **Ala**, alanina 0,2%; **Glt**, glutarato 7 mM; **Caa**, casaminoácidos 0,4%; **Pir**, piruvato 0.2%; **Ciclo**, ciclohexanocarboxilato 3 mM; **3MBz** 3mM. Las barras blancas representan cultivos en una de las fuentes de carbono mencionadas. La barra negra indica el cultivo en 3MBz. Las barras rayadas indican un cultivo en una de las fuentes de carbono, a la concentración reseñada, más 3MBz 3 mM. Los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron tal y como se indica en el apartado 6.1 de *Materiales y Métodos*. Los datos mostrados son el resultado de un solo experimento, pero los valores fueron reproducidos en tres experimentos separados e independientes y presentaron una desviación estándar inferior al 10%.



Por otro lado, se analizó si el promotor  $P_{3R}$  del gen regulador *mbdR* era también sensible a represión catabólica. Mediante experimentos de RT-PCR se comparó la actividad del promotor  $P_{3R}$  en células de *Azoarcus* sp. CIB cultivadas en 3MBz, piruvato y una mezcla de ambos compuestos. Como podemos observar en la Figura 41, el piruvato no ejerce represión catabólica sobre la actividad del promotor  $P_{3R}$  a pesar de que sí lo hace sobre el promotor catabólico  $P_{B1}$  (Fig. 40).



**Figura 41. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos a partir del promotor  $P_{3R}$  de *Azoarcus* sp. CIB.** Las células de *Azoarcus* sp. CIB utilizadas para la extracción del RNA total se cultivaron en condiciones desnitrificantes hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento empleando 3MBz 3 mM (calle **3M**), piruvato 0.2% (calle **P**) o una mezcla de 3MBz 3 mM y piruvato 0.2% (calle **P+3M**) como fuentes de carbono. La extracción de RNA y las reacciones de RT-PCR se realizaron tal y como se indica en el apartado 3 de *Materiales y Métodos*. Los oligonucleótidos *mbdR*-A3 / *mbdR*-A5 (Tabla 5) se emplearon para amplificar el cDNA. La calle M contiene DNA del fago  $\Phi$ X-174, digerido con la enzima de restricción *Hae*III, como indicador de masa molecular. En el margen izquierdo de las imágenes de los geles se indican los tamaños de los marcadores (en pb).

## 8.2. Influencia del regulador global AcpR en la actividad de los promotores $P_O$ , $P_{B1}$ y $P_{3R}$

La imposibilidad de *Azoarcus* sp. CIB para crecer aeróbicamente en 3MBz, junto al hecho de que otros *clusters* anaeróbicos relacionados con la degradación de compuestos aromáticos muestren una regulación dependiente de la presencia/ausencia de oxígeno, como ocurre por ejemplo con los *clusters* que codifican la ruta central del benzoil-CoA en *R. palustris* y *Azoarcus* sp. CIB (Egland *et al.*, 1997; Peres y Harwood, 2006; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), planteó el interrogante de la existencia de un mecanismo de control similar que operara sobre el *cluster mbd*.

Como se ha indicado en la *Introducción*, en *Azoarcus* sp. CIB se ha descrito la existencia de AcpR, una proteína ortóloga de Fnr (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), que en condiciones anóxicas se comporta como un activador transcripcional imprescindible para que se produzca la transcripción de los genes *bzd*, codificantes de la ruta central del



benzoyl-CoA en *Azoarcus* sp. CIB, a partir del promotor  $P_N$  (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). Como un primer paso para detectar si la proteína AcpR podría estar implicada en el control del *cluster mbd* se procedió a cultivar anaeróbicamente la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (Tabla 3; Durante-Rodríguez *et al.*, 2006) en medio MC con 3MBz como única fuente de carbono. La cepa se mostró incapaz de crecer en 3MBz, pero cuando se complementó con la construcción pIZ-FNR\* (Tabla 4), que expresa la proteína Fnr\*, capaz de suplir el efecto activador de AcpR sobre  $P_N$  tanto en experimentos *in vivo* como *in vitro* (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006), el fenotipo observado revirtió. Este resultado confirmaba la implicación del gen *acpR* en el metabolismo anaeróbico del 3-metilbenzoyl-CoA en *Azoarcus* sp. CIB.



**Figura 42. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR obtenidos a partir de los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  en *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dacpR*.** Las células de *Azoarcus* sp. CIB (*wt*) y *Azoarcus* sp. CIB*dacpR* (*dacpR*) utilizadas para la extracción del RNA total se cultivaron en condiciones desnitrificantes hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento empleando alanina 0.2% como fuente de carbono y en presencia de 3MBz (3 mM) como inductor de la expresión a partir de los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$ . La extracción de RNA y las reacciones de RT-PCR se realizaron tal y como se indica en el apartado 3 de *Materiales y Métodos*. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los productos de PCR fueron: *PmbdO* F1 / *bcrB* R2 ( $P_O$ ), *PmbdB1* F1 / *mbdB1* R1 ( $P_{B1}$ ) y *mbdR*-A3 / *mbdR*-A5 ( $P_{3R}$ ); su secuencia se detalla en la Tabla 5. Las calles M contienen DNA del fago  $\Phi$ X-174, digerido con la enzima de restricción *Hae*III, como indicador de masa molecular. En el margen izquierdo de las imágenes de los geles se indican los tamaños de los marcadores (en pb).

Con el objetivo de analizar si la inactivación del gen *acpR* suponía un cambio en la actividad de los promotores del *cluster mbd*, se procedió a realizar experimentos de RT-PCR para evaluar la transcripción desde los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  en las cepas *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIB*dacpR*. La actividad de los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  disminuyó en la cepa defectiva para el gen *acpR* (Fig. 42). El análisis de la secuencia de los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y  $P_{3R}$  reveló la existencia de posibles regiones operadoras para la unión de AcpR. La secuencia palindrómica reconocida por Fnr es TTGATN<sub>4</sub>ATCAA (Spiro y Guest, 1990). En  $P_O$  la secuencia TTGACAGCAACA difiere en dos bases de

la secuencia consenso y la separación entre ambas cajas palindrómicas es de tres bases en vez de cuatro. Por otro lado, en  $P_{BI}$  la secuencia TTGACACATACCAG difiere en tres posiciones respecto al consenso. En ambos promotores estas regiones se localizan entre las cajas -10 y -35 solapando con la caja -35 (Fig. 27). En el promotor  $P_{JR}$  se localiza la secuencia TGGTGTGGCCAA, que solapa con la caja -35 del promotor. En conjunto, todos estos resultados sugieren que el *cluster mbd* está sujeto a un control por oxígeno mediado por la proteína AcpR.

## **ANEXO**





CTACTCAAGCGCGGAGCGTTTTCGAGGAATGCCGCGACGCGCTCTCATGCTCGGA 60  
 E F R P S R K E L F A A V A E E H E S 60  
 AGTCTTGTGCGCTAGTCTTGGTAGGTGCTGAAAGCTCCAATAGGAGCTCCAAGCGAC 120  
 T K H A L A Q Y T A S L E L L S E L R V 120  
 STACTGCCCTCCCGCAGAAGTCGTTTCGTCATACGTAGTGCAGGCGCAGGATTGCAAC 180  
 Y Q G E R L L R K T M R L A P G P N C V 180  
 AATACGCTGGCGCACTTGTGTAGCAGTCCAGCACTCTCCAGGCGCTACACGAGA 240  
 I R Q A L K N A V D L L E E G P V V R S 240  
 CACCAGCGCGCTCGAGAGCGCTTTCGCGGGAATGTGATCGCCGTAAGGACATTTTC 300  
 V L G C E L A E Q A S I P D G T F S M E 300  
 CGCCGCGCGGATTGACCTACTACACGCGGAGTAACAGCGCCCGCATCGCCGGAAC 360  
 A A R S Q G V V R P L L W A G G D G P V 360  
 AATCCCGAGCTTCACAAAGGACTCCGCGAATATGCTGACGTAGCGCGCATCCGGATATC 420  
 I G L K V F S E A F Y A S T A A I R I D 420  
 GCACATGATGCTAGGTGCGATCTGCGCGGATCGCCCTCCATTTACTGCGCGAATCAC 480  
 C M C A L D C G A G I A G G N V A A I V 480  
 GGGCAGCTCAAGATTGTAGAGTCCAGCGGAGCGCTGAATTCGCCGCGATATTCGTC 540  
 P V E L N Y L A L P L R Q I G R R Y E D 540  
 GCTGATCGTATCGGATCCACTTCTCTCTCGAATAGCGTGCATGCTCAAAATTTTC 600  
 S I T I P D V K E K S Y R Q M D K L N G 600  
 GCGCGCGCAAAACATCGTTCCCGCAGCAAGGATGACGCGACGCGCGGATCCAG 660  
 G A C F M T G A G T L I V A R V T P D R 660  
 GCGGATTCGGGAACATGATCGACGAAGTCTTCGCGCGGGAATGCTGTCAGCACATT 720  
 A I R S C A D V F D E V A S N G T L V N 720  
 CCGGAGTTCGGGCTGATTCATGCTGATCGCGGCGCGCTTCTATCGACGAGCAG 780  
 R L E P Q N M T M T I V P G N K D V L L 780  
 GAAACTACCACTTATTCGCTCTCAATATCAAAATGGATTGGACAGATCAACCGCAAG 840  
 F S G ATAAGCAGAGAGTTATAGTTAACTAACCTGTCT G A L 840  
 CTCCGAGCTACGAAATCCAGAGTTCGTGACGACCGGTGGCAAGGATTGCGCCGACG 900  
 S R R V F D L T R S A G T A L L E R G V 900  
 ACCTTTGACCAATATCTCGGTGCCATACGCGAGGCGCGCTGTCATCTCGCGGTGTG 960  
 V K S W Y V E T G Y A L R W E H M R R T 960  
 AAAAGTTGCAATCATATTCCTCTGTAACCCCTATGCGCGTGGAGGAATCGCAATT 1020  
 F L Q L D Y E E T F G M A G H V S H A I 1020  
 GACGACATGTCGCGACCACTCGTGGTACGTTGCTTGGCAGCGCGGACCATCAAT 1080  
 S S V T G V V E S T R C K A V A A A M L 1080  
 TTTGGATTATCCCGTCGGCACTGAACCGATCTGGGCGCATTCGGGCGCAAAACC 1140  
 K P S I G D A S F G I Q A S M R A A F V 1140  
 TGCTCTGCCATGACATGATCTGCTGGATGATTGAAGCTTTGGATCGGCTGCGG 1200  
 Q E A M V S I Q Q Q I Q L K A I P R G 1200  
 AATGCACTGATCATTTGGCATACCTATGCTCATTTGCAAGATCCGCGCATGATCCG 1260  
 F Q V R D N A Y G I T M Q L I R A M S G 1260  
 GCGAGCATTCGAGATCAGACGCTCCATATGCCGCGAGTTGGATCCAGGAAGTTGG 1320  
 A L M A S I L C A G Y A R W N S G P L E 1320  
 TTGCCAGAAATCGGCTGTTTGGCCCATCGCATTCGGGATGACGCTCCCGCACCCCG 1380  
 N G S I P Q K A W R M R A N V S G C G G 1380  
 GCAATGTGCTTTGGGCGCGGTCGCGAGCAATAGCTGCGCGCATCGCGAAATCCACC 1440  
 A I H R Q A G T A P L L Q A R D G F D V 1440  
 AAGACCGAGTCAGCACTTCCCAAGCGGACGTAATTCGATGATGTTTCCGTCGGA 1500  
 L V W D A V E G F P V Y N S I I T G D P 1500  
 GTCACCGCGAGCTCCAGCAATCGTTATGACCCCTCTGGAAGCTCGGCGTGGTCTCG 1560  
 T V A V D G A I T I S G E P L E A N T E 1560  
 GACATGATTCCTCGGACCAATATGCTGTATTAACGGTAGCGGCAAGGATGGGACCA 1620  
 S M I G R V L I T Q I L P L P L A H R G 1620  
 GCAACAAAGGCGATCGGATAGACATCGGACAGACTCAATCTGCCCGCCCATCGCTTCA 1680  
 A V F A I P Y V D S L S L G A G G M A E 1680  
 GCCACCAAGCGCTCGGTAAGCGGAGCTCTGTAATGCCCGCAAGTCGGGACGTTCC 1740  
 A V L A D T F G S E Q L A G W L A A R E 1740  
 TTCGTGCGCGCTCTCCCTCTGATACGCGGACATGATTGCGGTCACAGCAATGAGCG 1800  
 K T G G E G R E I R R V H N P T C C H A 1800

AGCAGTTGCTCTATCGGTCGGATATGATTCTTGATGACCGCTGTCTCTACCGAAGT 1860  
 L L Q E I A D S I I E O CTGGCGACAGGA R L 1860  
 CCGAGCCCGCGGCGATTCATCCAGCAGGATTTCCCGCGTCCCGCTCGCAGAGAGAAT 1920  
 G L G R A I M G R L I E R T G G R L S F 1920  
 GAAGGAGAAATTTGTGTCAGTATGCCAGGTTTCAACAAGCGGATGGCAGCGGACGA 1980  
 S P S I Q T V Y A L T K L L V S P V P R 1980  
 TCCGATCGCCCCAGGCTGTGAGCAATCAGCAGCGCATCTGCTGCTGAATTCGGTT 2040  
 D P D G G L S D A I L L P M Q Q E F E T 2040  
 CCCAAGTCTTGACTAGCGCGCTCAATCAGCGGATCTCACCCCGCTAGTTTTC 2100  
 G L D K V L A A E I V P S E G R A L K E 2100  
 GTGACGAAATGGCCATCGCAGCAGCAGCATAGTTGGCTCGCCATCGCGCGAGTAAC 2160  
 T V S I A M A R L V C L Q S A M R G L L 2160  
 GCGACACGCCCATCATCGACACGCTATCAGCAGAGAGAAAGCAAGCCACTCGTCAAG 2220  
 A V R G D D V R T D R C L F A L W E D F 2220  
 AGAACCGAGTGAATAAATGCGCTCGGCGCACTGCGTTCGAACGCAAGTTCGCGCTC 2280  
 L V L T S Y I R E P G S R E F A L E A T 2280  
 ACTTGCTCCCAACCGGACCCCTCTGACCGATCAGCGCATCGTGACTAGCATCACGTCG 2340  
 V Q E W G S G E A G I L A D H G L M V D 2340  
 TCGAAAGAGCTTCACAGAAATGAGCATCCCGCTGATATCGTAATCGCGCGCAGTC 2400  
 D F F V E C F H A D G T I D H I P R V T 2400  
 ACGCCCTGCAAGAGAGATCAACGATCATCTGGGACAAGCCCTTGTTCGATCCGCGGT 2460  
 V G Q L S L D V I M Q S L G K N R D A P 2460  
 TCCCGGATGTGCGCAAGTGAATCATGTAGTGGAAACGTTAAGCTTTGCTGCTCAG 2520  
 E G S T R V L A I M Y H S R Y A N T T W 2520  
 ATCTTGCTCGCTTCACTTCCAGCGCTATCGCTCTCACCGCGGAGTTGTACGCTG 2580  
 I K R G N L K W G S D T R V A R T T V S 2580  
 GCGAGATCCGACCCGAGTTAGGCTCACTCATACCGATGCAAAAAAGCTTCGCGCGG 2640  
 A L D S G S N P E S M G I C F F A E A R 2640  
 CAGATCTAGGAGATAGTATTTCTTCTGCGCTCGGACCCATATTTATGGATCAAGGG 2700  
 C I R P L Y Y K K Q A E S G Y K H I L P 2700  
 CCGCTCTGGCGTTCGCAATCCAGTGAGCGGTGACGGGAGCCCTCGAGAGCAGCTCC 2760  
 G S Q R D A I W H A T V P A G A S L L E 2760  
 TCCAGCAGCAGAAAGCGCGGAGCAACTTGTGCGCGCGCGGCTATTCCTCGGCGA 2820  
 E V V V F R A F S S R G G G G Y E K P L 2820  
 GTCAACCGAGCCACCTTTCGCGGCAAGCGGAGCTAAAGTCGCGCTGAGCCCATC 2880  
 T L G L W G K A A L R R S F D A D Y G M 2880  
 CAGGACCGGCGACGACATCGGCGGCGACCCCTTCGAGGCTTCGTCAAGAAATGACGC 2940  
 W S R A R V D A P V G E L A E D L F A R 2940  
 ACGGAGACTCGCAGACCTCTCTCGGCGGGATGGATGTAAGCTCAAGCGACTCGATC 3000  
 V S V R L G E D E A P I S T L E L S E I 3000  
 ATGAATCTCCATCGTTCTATTGAATGCTTGCAGCGCGCTAGCGCGCTCGGAAATCG 3060  
 S N E M T R N P T E G R R L A A R P D 3060  
 orf7  
 GATGTGCCACGGCACTGAGCTCTAGTGCCCGCTGCGAGGCGATTATTTCGAGTCGAG 3120  
 P H A V A S L E L A R Q A P S K N R L R 3120  
 CAACCCCATACTCGGTACCAAGTAATCAATGCTTTCGCGCGGATGTCGTGGGAGCTC 3180  
 A V G Y E T V V Y D I D Q A G I T T P V 3180  
 CCGGACCGAAGTAGTACAAATGTTGCTGACCGCCCGCTTTGGTTGCTGACGAGTG 3240  
 G R G F T T V I N S V A G G K T A A R L 3240  
 CGATGATGCTCATACCGCGCTCTGCTGCTGATGCGCCCTTCGAAAGTCGGGCAATCTC 3300  
 A I I S M G G K A A S A G R A F D P L G 3300  
 CGGGGTTGAGATCACGCGACCAAGCTGCTGAGGTTGGGACTGCCATTATATCGA 3360  
 G P T S I V R G G I Q E A N A S G N I D 3360  
 orf6mut Xba1 3'  
 CTTGCAAAACGCTGTTGATCGCAACGAGCCATCAATGCCGCGAGGACATCAAGTCGT 3420  
 V Q L V S N I A V L G D I A A L V D L A 3420  
 GTGTAAACGAGCAGGATGAAATTCGACCAACGGGTTATGTCGAGAAACCATAGAAG 3480  
 H T F S C P H F E V L P N H D L F G Y F 3480  
 ATCGGGTACCTGACGACCTGTTGTGACCGCTTACCCCGCAACACCTTCTTCTGCTGCT 3540  
 S R T G A A M T T V T K G P L V K K T A 3540  
 TAGTCACGACACCGCTGATCAGCGCGGAGCGGATCGGTGATGATGCGCTATGGA 3600  
 N T V V G R E I L P R V G D T I I G S H 3600

TCCCAAAATCGTATAGGTGGCTCAGTTTCGGTGAACACAGATCCGGCAAGGCTCCGATGC 3660  
 I G L D Y L H S L E T F V L D P L A G I 3660  
 CAGCCTGCAACACGGCTCCAGACGAGATGAGACCTGTATATTTCTGCGATTGTCCGGT 3720  
 G A Q L V A G S S I L G A I N G A I T R 3720  
 CAACATCGTCAGTTTCGTCGGTTCGGCAGCGCAGACCTGTGGCGCGATTTCGAT 3780  
 D V D D T E D T D A A R V V Q P G R N A 3780  
 TAACGAGAAATCGACCTCTCTGGCAGCAACCGGTGTCTCCGAGGTAAATGCATCT 3840  
 N V V F D V E E P L L A T D G C T F P M 3840  
 GCGGGTCACTCCGCAACGAGGATGGATCTGAGCAAGGACCGCCGATATAGTCGA 3900  
 Q P N V E A V V I P D Q A L V A R M Y D 3900  
 CCGACACCCGAGAGACATTTCCCATTTTCGTCGGCGTAGAGACCTGTAGTAGCAGGA 3960  
 V S V G L S M R G N E D P T S V Q L L L 3960  
 GATCGGCCCTGATCTACCGCTGATGAAAAGGTTCGAATTCGGACAGCTGCAGCGCC 4020  
 L D A R I E G S I F L T P I E S L T C R 4020  
 GAAAGAAGCGCGGCTGAATTCGATCGGTTCAGCAATCCCTTTCCGGAACAGCGCT 4080  
 R F S A R G S N T P E R L G K G P F L A 4080  
 GGATCGAAAGATGCTTGGCTGCTCTATCGCAGCATAGGGCGCTTCGCCCATCGGCATGA 4140  
 Q I S L H K A A E I G A Y P A E G M P M 4140  
 GCCCATACAGCGTCCGCCACCGAACCTCGGCTGCTCAGTTGCTGAGTCAAGC 4200  
 L G Y V T A G R F V E A A E S L Q O T L 4200  
 GCGGAGCTCGGCACACGCGAGTGGAGCACTATCGTGGCGCATCTGCAAGCGGAAC 4260  
 R P P E A C A S H L V I R P A D P L A S 4260  
 GTAGGTCITGGAGGTGGCAGTGGAGTCTTCGCCGCGGAGTAGTCACTACTCTT 4320  
 R L D Q L H S L Q L R K G R P T T 4320  
 GTCTCCCTTACGTTTCAAGATCCITTCGCGAGCTTTCACCCCAACCGCCCGGTACA 4380  
 CAGAGGAGAGTCAAGTCTTAGGAAACGCTTGAAGAAATGGGGTGGCGGCGCATGT 4380  
 TCTCTTGGCGATCGGTTGGGCTTGGCGAAGTAAGACCGGTTTCGTTGCAATCAATTCG 4440  
 AGAGGAACGGTAGCCAAACCGGCTTCACTTGGCCAAAGCAACGTAAGTAAGCG 4440  
 GCCAAGTAGGAACATCAATTTCTTGAATCCCAATGGCATATTGACACCCATGTCGCC 4500  
 CGGTTTCATCTTTAGTTTAAAGAAGACTTAGGGTTACCGTATAAACTGTGGGATCAGG 4500  
 CTGACACGTCGAGATCGACATCGTGGCGGATGATGCGCTCTCTCTCAGAGACTC 4560  
 GATCTGGTCAGCTCTAGCTGTAGTAGCGGCTACGTACGCGGAGGAAGAGATCTCTGAG 4560  
 GAGCCTTCGCGATCTGATCAAGAAATTCGCCATTACAGTGAACCCGATATTTCTTC 4620  
 CTCGGAGGCGCTAGTCTAGTCTTTATACGCTAAGTCTACTTTGGCTATAAGGAAC 4620  
 CTCAGGATCACCGGCTACTTTCCGAGCGCAATGCGAAGTTCATTAAGCTTTAAGTGC 4680  
 GAGTCTAGTGGCCATGAAGGGCTCGCTTACGTTCTTGAAGTGAITTCGCAATGAGC 4680  
 ATCAGAAATCGCGAATGAAGACAACTCCATCAATTGATAACCGATGCGGGGCTTGA 4740  
 TAGTCTTAGCGGCTTACTTTCTGTTGAGGTAGTTAAGCTATTGGCTACGGCCCGAAT 4740  
 GAAACGCAAAATTAATTTATCCCGGCAGACGCACTGTTGTTTCTCGCTCTTATCCC 4800  
 CTTTGGCTTAAATTAATAGGCGCTCTGCTGGTAAACAAAGGAGCGAGA 4800  
 \* G  
 GTTAGGCGACGTGAATGCAACATCGTCGATGTCTCCAGTGCCTCGTATATCTGACAA 4860  
 T L A R A I V L R Q M D G T G E Y I Q C 4860  
 ACTCGAACATCCCGGTAGATCCGCTCGAGTGGAAATCAGCCAGGTAGCGGTATCCTCC 4920  
 V R V D R Y I R E L P F D A L Y G Y G 4920  
 AAGGTCTGATCGATCCGAGCAGCCGCTCAGCGGTTTCGCTCGCAGCACTTCGCG 4980  
 L T Q I A D S C V R E A T E S A L V K A 4980  
 ATCGATGCTCTTTGACGACGGGTAAATCGGCGTCACGATGCGCGGACGTGTAGCACC 5040  
 M S A E K V C P L G A D R M A A V H L V 5040  
 AACTGCTCAGCGCTTCGAGCCGCTGGCCATATCGCGAGGCGGAATGCAACTGCCTGA 5100  
 L Q E A A E L R T A M D A L R F A V A O 5100  
 TGCTCGATGAGGAGTTTGCCGAATTCGCCGCTTCTTGGGATAACCCAAAGGCGTCTCA 5160  
 H E I L L K G F Q R R E K A Y G L A H E 5160  
 AACGCCGACGCGCCATACCCACCGACTGGCGCGATGCCAAGACGCGCGCTCAAG 5220  
 F A A R G M G V S Q A A I G L R G G D I 5220  
 TGGGAGAACGCAACTCGCAGCCCTTCGCTTCTGCCCAAGAGGCTATCGGCGCAAAAC 5280  
 H S F A V R L G E G E R G L L S D A S V 5280  
 CACATGTCATCGAATGTGAGGAGCATGTATCGGACGAGCGCTGGCCCATCTTTCTCTCA 5340  
 W M D D F T L S C T D S S R Q G M K E E 5340  
 ACGCGGTCAGGTCACCCCGCGGTATTTGGTGGGCAACGAAAGCGAATAATCCCTCT 5400  
 V R T V T W G P T N T P V V F A S I G K 5400  
 TTGCGCGCGGTGGGTGGTAAACAGCGAAGCAATGCCACGCTCGCATTTCCGCGCGAG 5460  
 K G A T P D T V A F V I G V S A N R G S 5460  
 GTGATGAATTCCTTACCGAGATGACATACCCGAACGGCATCTTGGCGGCTAGC 5520  
 T I F Q K T G S I V Y G S R G D K R A L 5520  
 GTCTTCATGGAGGCGGGTGGATCTGCTTCTGGCTCCGTAGGAGCAAAACAGCAAC 5580  
 T K M S A P D S G A E P E T L C F C G 5580  
 orf5mut HindIII 5'  
 ATCTCCCCACGCGCATAGGACGAAGGAGCGGTCTTCTGCTGCTCCGTACCATAGGTG 5640  
 M E G R A M P R L F R N K Q E D T G Y 5640  
 AGCACCGGAGGAGCATACCGATGTGTTCGCCCATGATGTGGAATCGGACCGCTG 5700  
 L V P L C C V S T H E G M I T S I P G 5700  
 orf5 R1  
 CCGGAGCAATTCATGATTCGCCGCAATGAGACATAATCGGTTTCGCGACCGCTC 5760  
 G A A I E M I A A V Y S V Y D T E A G 5760  
 CACTCCCGTGGCACCACCATGCCCATGAAGCCCAATGTTCTAACTCGCGAGTTCCTA 5820  
 W E R P V V M G M F G L T G L E A L E 5820  
 GCAGGAAACGGCAATTACGGTCGCGCATAGCGCAGTGGGCGCAAGCGGTGCGCGGT 5880  
 A P F R C N R D R M A A T P A L R D R A 5880  
 ATTTTCGAGCTGTTTCACGGATGAACGATTGCTCTCGTTGAGAATCATTTCAACACT 5940  
 I K R A T E R I F S Q E E N L I E V 5940  
 CACCGTTTCGCGCAGTGTCTTCGCCCGGATACATAGCAAGTCAACGCTTCGCAAAAT 6000  
 GTGGCAACGCGTCAAGCAAGCGGGCTATGATCGCTTCAGTGGCGAGCGGTTTAA 6000  
 CATATTGTCGAAGGCGCAGGGGCTTCGCAATCATCGGTCTCATATCTGTGAGGATG 6060  
 GATAACAGGTTCCCGTGCCCGACGCGTTAGTAGCAGAGTATATGACAGCTCTAIC 6060  
 CCGCTACCTTCGCTAGCTTGAATCGTCAGACGATCGTCCATGTGTGCGCGCGGTGA 6120  
 GGGAGATGAAGCAGATGCAACTTGAAG 6120  
 \* V I T W T D G G H  
 GCAGATCCGCGAGCGCGCGGCTTTCGCTTCGCGGTAGCTTCATGAGATGCGCT 6180  
 L L D A L R G R G K A E R T A E H L H A 6180  
 TCAGCTCGTCGAAGTCGGTTGACGCACTGCGCGCAACACGCGGAGCGGCACAGGAGT 6240  
 N L E D C T P Q R V A R F V G L P V P L 6240  
 korB2 F1  
 CCGGGAGCTGCAATCGCACAGGAATGCGAGCGCGCTGTGATCGCATGCTGCTCAT 6300  
 E P S E F Q S L F F A L G S H M A H E 6300  
 SGACGAGAGCTCCGCTCGCTCACCGCGCGCTGCGGAGCTTGATAACTTCGCGAGCA 6360  
 H V V L E A E S V A G D G L K I V E P A 6360  
 TGCCGGGAGGCTGATACCTGATCGCGATTTTCCGCAACACGAGCGGCTTACCGTGT 6420  
 M G A L R I G Q D R N K G F V L P K G H 6420  
 CGAGCATGAGCGCTGCTGCTGCGCGTGGCTTCTCGGTGAGCGCATTTGTGCGCGCT 6480  
 E L M L R A D D R T A K E T L A N H A 6480  
 CGTTGAACAGATGAGCTTCTGAGCACTCGACGAACCGGCTGCTTGTGCGAGCGG 6540  
 D N F V I C N Q L V E V F A T G K H V A 6540  
 CCGCGCAAGCACGACGCGAGATGCGGCTGATCGCTGTGACGCGTGCCTGCGAGCAAG 6600  
 A R A L V S A L H P Q D S D V T R A V F 6600  
 TCGCGCCCGCGCGAGCGGAGGACACTGGGGAGAACGCGCGTGCATGCTGCGGAGCG 6660  
 T A G A G L A L S V P S F P R D I S G L 6660  
 GCGTGTCTCTGCTCTTTCGCCAACTCGGAGCTGCGCGAGTATTGCTCCCTTTGTCAGCC 6720  
 P T S K T R K G F E S T F S Y Q G K T L 6720  
 CGTAAATCGGTTATTGAGAAGATCACTTCAGTGCAGCTTCGCGCGCATCGGCTGA 6780  
 G Y I R N N L L I V K L D V N R R M A H 6780  
 TGAAGTATTCCGCGCATGCGGAGCGCTCCCGTCCAGCGTGACGACCATACCGGACA 6840  
 I F H N G G I A L A D G D G T V V W V S 6840  
 GCTCGGCGCGGTGAGCTTCAGGCGCTCGCATCGTGGTGCAGCGCGCTGAGTGTGT 6900  
 L E P R T L K L C S A I A P A R G H I S 6900  
 GTATCCCGTAGGTTTCATGTAGTAGGGAAGCGGCTCGAGCAACCGGATACCGGAGATGA 6960  
 H I G Y T E M Y Y P F R S S C G I G S I 6960  
 ACGCGAAGTTCTCGCGCGGATGCGGAGCTCGGAGCAGCTCTGAGACTGCGCGAGGA 7020  
 F A F N E R P I G L T P L L K Q V Q A L 7020  
 TCGAGTAGTCCGACAGCGAGGACAGCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 7080  
 I S Y D G C G P C W R V D Q N S E F D K 7080  
 TCGTCAGTGCAGAGGTACGACAGGTCAITCATGATGTTTCTGTAAGGGAGCATGG 7140  
 CTACAAAGGACATTTCCCTCGTACC 7140  
 K T L A V P V S L D N I N E Q L P L M  
 korB2  
 GGAAGCGGCGACCTCAGCTCAGTTCGAGGATGCGGTGCGACTTCGCTGACCTTGAAG 7200  
 C T G C G C G C G T G C 7200  
 \* S L E L I R D H V E S V K F  
 GGCTTGCCTGACCTTGTGAGCGGACGACGCTCGCGAGGAATGCTTCCGCGAGCAGC 7260  
 P K G Q V K T T L P V V D R L F Q E R L L 7260  
 TTCAGAGTTGCCCATATTAGTTCGGGTACGAGGATGTCTTGTAGCGCGCAGCACC 7320  
 K S L Q G M N L E P V L V T K Y R A L V 7320  
 TCGCCCAAGTCCGCGGACGCGGTGCAATGGCGAGATGACGTGCGCGCAGGAGCGC 7380  
 E G L D P P L P H L H R L H V H A V S R 7380

CCGTCGGCCTCGGCTATTTCGCGCCCTGCGCGATCGTCCGCTAGGTGCTGCCCGACCA 7440  
 G L A E A I E R A Q A I T G Y T S G W G 7440

ACGACGAGGAGCTGCGCGCTGCGCGCCCTGACGCGTGTGCGCGGATATCTGCGCA 7500  
 V V L L E G S A P G E V R T P P I D Q A 7500

GTACGCGGCACTTTCGCTGCGCGACCGCAACCATCGTGTGGTATTCATCGGCTGTCG 7560  
 T R A V K A A R V A V M R Q H N M P D H 7560

GAGATGTTGCGCGACGGAAGTCTCTTCGAGCGCCGCGACGCGATGTTCCATCCGCGC 7620  
 S I N G S L F D K E L G G V R H E M G R 7620

GTGCGCGGACGACCGGACGCGCGAGATTCGTCGCGCGCATACGGTGGAAACCT 7680  
 T G P L V W A R A L N E D R A Y P Q F G 7680

TCCGATCGGTGCGATAGCGACTTCGAGTTTCGCGACGCGGCCACATCGGGATGCGC 7740  
 E A D T R Y R V E L K P L R A V D P I R 7740

CACGCTCGGCGCATTCGCAATCGCGCCATCGGTGACGAGGATCACCGGCTCATGTAT 7800  
 W P E A A N A I G G D T L L I V P T M Y 7800

TTGACGCGGATGCGGAAGCTCTGAGCGCGCATGGAAGCATCGAGGCGAGCGCGCG 7860  
 K V A I R F A E L A C D F C D S P S R A 7860

GAGATGCGGAATCGGCACTGCGCGTTCGCGCCGATGACCGCTGCGACGATCCGAT 7920  
 S : V P I P C E G N R G Y V A Q L L D S 7920

TGTCGATCTTCGTCGCGAAACCGGTGAGGACGCGCGCTGACGTTGACGATCAC 7980  
 Q E I K T P L G T S P G G R Q V N V I V 7980

AACGCTAGCTCGAGCATCTGCGAGGCGCAACCGCTCGGTCTTCGCGCCATGCCGGA 8040  
 L P L E L M V A L G L A E T K L A M G P 8040

CCGAGGTCGTCGTCAGGCGAGCGCGCCACCATAGCGCGCACCATGTCGAGCAATG 8100  
 G S T T T L A L A G G Y A A G I T S C I 8100

CCGCGATTCGTCGTCGCGCTGGAATGCTGCTGACGTCGAAATGCTTCAGCGCGACAGT 8160  
 G A I E D E A Q P T T V D F H K L A S L 8160

TCGTGCGAGGATGTCGTCGCGCGGTGATCGGGTACGAGCGAGGAAGAGCCCGCT 8220  
 E H L I D T A P T I P Y S G L F L G V G 8220

GAGAGCTCAGATGCGCGCGAAGCGGACGCGCGCGATGCTGCTGCGATGATGCTCGCA 8280  
 S L E S A A V F G L A A A H N G T I S R 8280

TAGACGCGCGGCTCGCGCGCGCTTCGCGCACATGCTGCTGCGCGGAGATCTCGCGC 8340  
 Y V G P E A A A E R V H Y S A A F I E A 8340

GCGTCGCGATACGCGAAGCGCGGACGCGCGCTCAACGTCGCGTCGCGAAATGCGGG 8400  
 A D A Y A F G A R L A E V N A D A F Q P 8400

GTCTTCGCGCACTTTGGTGATATCGTCGATTCGCTCGATCGACCGGCGCATAAAGG 8460  
 T K A F K Q H I D D I E D E I S R G Y L 8460

CACAGCATCAGGCGGACGCGAAATAGTTCCTGACGCGCGACCTCTCTTCGACAGC 8520  
 C L M L G L A F Y N K C R A V E K K S L 8520

CCGAGTCCCGACGCGCGCGCGCTGAGTCCGAGATATGATGGAATATGCGGTAG 8580  
 G S D R L A A A T L A S I D I H F I R Y 8580

CCGTGCGAGGTCGCGCTCTGAGCGGATAGAGGTATAGCGCGCTTACTAGGCTCGCG 8640  
 G D L S G D E L P N S T Y G A K V L S A 8640

TCGGTGAAGGCGCGGCTTAAAGATGACGATGCCACCGTCTGACGTCGGAATGTTCT 8700  
 D T F A G V N V I V I G G H K V D S I N 8700

GTCTTCAGCGCGCGGATTCATTGCGACGCGCGTGGCGCGTCCCGGATGTAAC 8760  
 T R L A A P N M A V L A D P A D G S T F 8760

ACCTGGCGCGCACCATCTGAATCTGCTGAGCGGACACCGGAACCGTTCGCGTCGGA 8820  
 V Q G A G Y Q I Q Y G S V G F V T G T P 8820

GCAAGATCTCCGACGGTAACTCGGATGCTGCGAAGCGCTGGCGGCTTTCGCGAC 8880  
 A R I E S P Y D P H T A F G H G A K A V 8880

GTCTCGGAAACTCGAGCTCTGAGTGCATGCCGTACCGGAGTCCCGACGAGCGG 8940  
 A R S F E S G T L Q M G D G S D G V F R 8940

ATCACGACGCTGTCGAGGCTCTGACGACACGCTGCGCGAGTCTGCTCCCTGACATG 9000  
 I V V S D L T E V V R E R L R E T G S M 9000

GCGTCGCGCGACCGCTTATTTCCCGCTCATTTACGAATACATGCTCCAGCTCGGAC 9060  
 A D G R V A K N E R E N V F V H E L E S 9060

ATACATCTCCCTCGGTGGAAGGACGACCTGTGTACCGCGACCTCGCGCGTCCCTTC 9120  
 TGTAGGAGGAGCGACCTCTGCTGTGACACAGTGCCTGCGTGCAGCGCGCGGAGG 9120

**korA2**  
 CGCATTTTGAATGCTATCAGCTGCTGAAGCGTACCTGCTGTATCTCGTTCAACT 9180  
 CGGTAATAATACGATAGTCGACGAACCTGCGATGGACGGAATAGAGCAAGTTGGA 9180

ACTGACTIAGCGAACCCCTCTTTCGCTCGAGCACCAAAACCGCCGTGAATACGGAA 9240  
 TGACTGAATCGCTTGGGAGAGAACCGGAGCTCGTGGTTTTTGGCGGGCACTTCATGCTT 9240

CTTGGCAATGTCGATCCCATGCTTACAATCGAGCGCGTTTCGACGCGATTCAGCCTT 9300  
 GAACCGCTTACAGTAGGGTGACG \* L R A A K A R L E A K 9300

CGTTTCGAGCTGATCGGGTCCGCAACATCGAGTCTACCGGACAGAGCTGGACGATG 9360  
 T E V H D P D A V I S D V P C V H V C Q 9360

CGACTCGTCAAAATGACCTACACATCTCTGCGACAAATTCGGGCGGATCACATAAATATC 9420  
 S E D F H G V C E T C L N P A I V Y I D 9420

ATTTCCTTGAGTAATCGCTCGTTCGGGCAITTCGTTGGCAGGACCGCAATAGTGA 9480  
 N G Q T I A E N P C E T Q C A G C S T C 9480

CTATCTGTAATCAACAAGGCGATGATCCCTCTCTCAAAAGGCGCGGTGTTGCGG 9540  
 E D T I L L A 9540

TTCTTGCAAAAAACACCGACTCCGAGACGTGGCGTCCGCTCCAGCGGCTCGTCCGAGA 9600  
 AAGAACGTTTTTGTGTGGTGAAGCTCTGACCGCGAGGCGAGTCCGCGAGCAGGCTCT 9600

CATCAGCGCGCTGAGACTCTTGTGGAAGCGGCGCGCGGAGCAACCGTCCGGGCG 9660  
 GTAGTGGCGGCGCTGAGAACACGCTTCGGGTGCGGCGTCTGTTGCTTGGCAGCGCG 9660

TGAATGATCTTCCGACATCAGTTCGGCAATTCGGCGACACCAACCGCGACCGCAACA 9720  
 ACTTTACTAGAGGCTGTATGTCAGCGGTTAAGCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 9720

ACTCGCGCATCAGCTCTCTTGGAGGATGATCGAGATGGCGTGAACGTCGAGCGAT 9780  
 TGAGCGGTAGTGGAGAGGAATCTCTAGCTAGCTCTAACCGGACTTCAGCTCGCTA 9780

CACATACCGGACCGCCAGCGTCTGATCCGCGCAACGGATGGTCAAGGCGCAATTCGG 9840  
 GTAGTGGCTGGCGGCTGCGAAGTACGCGCGTTCGCTACAGTCCCGTTAAGCGC 9840

CTTCGATATTTACGTAGTGAACAAGCGTCTTGTCCGTGGTTCGATGCGCGCGTCCGAA 9900  
 GAAGCTATAATGATCGACTTGTTCGCAAGACAGGACCACTACGCGCGCGAGCCTT 9900

TAATCAAGCTCGTAATCGGACGTAATATATCAACCGCAATCAGCATCGATGCTGGC 9960  
 ATTAGTTCGAGCATACGCTCGCAATATATAGTGGCGTGTAGTGGTGGTGGTGGTGGT 9960

AAATACATTAATTAACACCGCTTAAAGCGGATACATCAATGAATGAATGAATGATG 10020  
 TTATGTAATTAATTTGGGCAATTTCCGCTAATGTAGTTACTTACTTACTTACTTACG 10020

GACTCTTGTGCAACCGAAATAGATCTCTGATTCGATCGAGTCACTGACATATTACGG 10080  
 CTGAGAACAGCTTGGCTTTATCTAGGAGACTAAGCTACGTCAGTGGATGTATAAAGTCC 10080

GATAACATCAGCGCAATTTCCGTGCTGCGGGGCTGCTATCTTCGCTCAACAGCTGTTA 10140  
 CTATTGTAGTGGCGGTTAAAGGACAGCGCGCCAGCAGTAGAAGCGAGTTGTGAC 10140

**mbdW** *NotI* 3' 10200  
 GCGATTTTCCACGCGGAGCGCTTTTCCTGAAACGCGAGCAACCTTCAAGCGCATC 10200  
 R N K W R P P R K E Q F A L L G E L A D 10200

AAAGCTATGATGAGGCTTTCGCCACATATCTTTTCGAGTTCGTCGAGGCGTTCATCAG 10260  
 V S N I L D Q G C I K E L E D L R E M V 10260

ACGGGTGTCATAGCCCCGCGCGCGCTTGAACGCGAAGCGAAGTGGTGGTGGTGGT 10320  
 R R T M A G R A A K V A F R L A N T S L 10320

CCCGGCGAGTGTTCATCAAAATAGGCGACCGCGGCGAGCACTGGGTCTTCTGCCACGCA 10380  
 G A L H E D F Y A V A A A V P D E A V C 10380

GTGACGAGCGCGCGCATCGCTCTGGCGCTGAAACGCTGCGCGCGGAGAACAGCAA 10440  
 N V L G L R M A E P A S V S R G S F L L 10440

ATCGTCGCGCGCGCTTGGCGGATGCGCTCGGGGAGAACAACTGGCGGCGAGTGCAGAA 10500  
 D D A A G Q G I R E P L L C S A A P A F 10500

GAAACCAACTTGATTCAGCTGACGGAATATGATCTCTGCGCGAAGATCAGACT 10560  
 F G L K I E P Q G F I A D E A A F I L S 10560

GCCCGCAAGGGCGACCTCCATCCCCACCGAGCACTGGCGCGCACCGCGACAGTAT 10620  
 G A L A V E M G G G L C Q G R V A V L I 10620

CGGGCGGGGAAATCGAGCATTCGTTGATTAGGCGGTGAAGTACAGCGAGCATTCCTGT 10680  
 P R P F D L M R K I L G H L V A L M G T 10680

CATCTGATCGGGAAATGCTCTCGATGCTCGGCGGAAGCTGAAGTGGCGGCCAGCATG 10740  
 M Q D P F H E E I S A G F S F H P G A H 10740

CTGAGCAGCACCGCGGACAGATTCGGTCTCTCGGATGCGCGTTCGAGCGCTGACTGAG 10800  
 E L L V A S L N R D E A H A D L A Q S L 10800

GCGTCGATCATTTGAGCATCGAATATTAGCTTTAGGACGGTTGACCGGAGCGCGAG 10860  
 A A I M Q A D V I N A K P R N L R L R L 10860

CAGCTTCGCGCGCGTTCGAGCGGACTTCAAGCGGTGTGCGGTATCTCTGGGTCTC 10920  
 L K A G R D L R V E L P T D T 10920

CTCAGTTTCTAGTGGGCGCAAGTTGTCGATCAGATCAGGCGTTCAGGCGGCGCGCT 10980  
 \* N R T H P M L N D I L D P T W P A G 10980

TGGCAAGGGCGCTGCCGAGAGCGCAAAATGATTTGCGCGCTGCTTCTTGTACTCTT 11040  
 K A L A Q R L A V F D I E R G A E K S G 11040

CGGCAAAAGCGGAAACCGGCGAGGCTTCGGTCATCATGTTCAAGCGAGCGAGCGCG 11100  
 E A F A R F G A C A E T M M N L A L W A 11100

GGTGTCTTCCTTGTTCGGTTCACGGCTCGATCTGGGTTTGGCAGGGCTTCAGGC 11160  
 R N D E K N R N W A E I K P K R L A E L 11160  
 mbdYmut XbaI 3' 11160  
 TCTTGGTCAGGCTATCCGGGAACATGGTCACGAATTCGGCAGCAGTTCTTCGACCTTGG 11220  
 S K T L S D P F M T V F K A C L E E V K 11220  
 CATCGAGCAGGCTCAGTCACTCGCGAGAGCAGAGCGCTTCCCTGCAGAGCG 11280  
 A D L L S L D V E G L A L L A K G Q L L 11280  
 CCTCGCAGTCTTCGGCTCGCGCAGTCAATCTCCGAATCTGTCGACGCAACGCTGG 11340  
 A E G T K P E G L V L E G F E D V C R D 11340  
 TGACACCAACGGATGGTACGAAATGCCGTCCACTTGAGGGCCGGCACCACGGCAG 11400  
 T V V L F P N P V F N G D V K L A P V V A 11400  
 TGATCATGCCAGGCGCGCGCTTGTGGCCGAGAGGACTCGCATAGCTGCCTACCG 11460  
 T I M G L R R A K H A S L S E C L T G V 11460  
 CGAGTGGCGCTTCGCGACGATCATCACCAGGAGTCCGTCGCGCGCGGATCATCG 11520  
 A L A A E A G I M V P L F D T A G G I M 11520  
 TCTCCCGCTGAGCTCGGAGCGAGTCCGAACAGGCAAGCTTGGCGATGGTGAAGT 11580  
 A G G H K P G A L G F L A L D Q A I T F 11580  
 CGCAGGCCAATCCAGTCTCTGAGGCGCGCGGTGCGCATGCCGTTCCCGCGCAATCA 11640  
 D C A L G L E Q A G G T R M G N V R C I 11640  
 CAGSTTCTCGCACCATCAGCGCGACACCGTATCATTGAACAGGCGCATGAATTGGC 11700  
 V P K E C V M V A S V T D N F L R M F Q 11700  
 GGAATCTCTCGGGTTCGGGGCTAGTAGCGGCAAAATCCGTCGCGTTGCCGCGGTGC 11760  
 R F E O P N R A Y Y R A F D T A N G G T 11760  
 AGAACGCTTCTGCGCGCGCTGTCAGGACGCTGACGACATCCGAGCGTTGCTGG 11820  
 C F A K S G A G T L V V S V D R A N S 11820  
 CTGTCTTCAACGCCACTGGATGCCCTTGAAGATGTCGACGCTGTAGGAGTTGAAGTGG 11880  
 A T K L A W Q I G R L M D V S Y S N F Q 11880  
 mbdYmut HindIII 5' 11880  
 CCTGATGTGCTAGTGTATCCAGGCGGTGATACCTGGGCGAGTGGCGCGCGCG 11940  
 A Q N D I T I W A H Y I G Q A L D G R P 11940  
 TTCTCGCGGGCGTTTTCATAGGCGACGCCCGGCACTACGACGTCGGGAGCCACCCGT 12000  
 T R A P R K E Y A V G P V V V D P A V G 12000  
 GATCGGTCACTTGCCTGGGTGCCCTGTGCGCGCAATCTGTCAGTAACTCTTCTCATGG 12060  
 H D T L O R P A R H R A I Q D T V S R 12060  
 TCGATTCTGAAATAGCATTCTGAGGAAACGAGCACTGCGCGCGCACCAAGCGCGGT 12120  
 AGCTAAGAGCTTATCGTAAGCA 12120  
 mbdY 12120  
 \* P V L V A R R V L R R 12120  
 CGTGTGCGCGCTGGAAAGCACTCGTGTATGATCCAGGGCACTCTCCACGAACGGCG 12180  
 D H A A Q P V E N I L D L P L E E V F P 12180  
 CGATCTTCACTTGTCTCCAGCAAGGTGAGGGCAGGGCGTGTCTTTCAGCAGGC 12240  
 A I K V K D E L V L D L A P A Y N K L L 12240  
 ATCCCCAGTTCGCGAGCGCGCGGATCGAGTCCATGAATGGAAAGCGCACTTCGA 12300  
 C G W N G L A R A H L A M F N S L R V E 12300  
 CTTGTTCAGGCTGAAGCACAACGAGAGGTCGCCCGCGCACAGCAGGCTGAAGG 12360  
 V K D L T F G V V C L T G G R V L L S F 12360  
 CGCTTCTGCGCGCGCGCTGCCGAGCACTCGAAGATGGTCCATTGATGGGCGCA 12420  
 A S E Q G A R T G S C E F I T W E I P R 12420  
 ATCCGCGCTCCCGCGCAACCGCGGATGCGCTTCTTGTGTCGGGCTGTCGACTTCCC 12480  
 L G R E R A F A A I R K K Q E R S D V E 12480  
 GGGCGTTCAGGCTAGGGCGGCAACGTAATCGGCAATCAATTCAGCTTGGCGGATCGA 12540  
 R A N L T L A A G Y D A I M K L K A P D 12540  
 CATCGATCGCGACAGTTCGCAACCATCGCGGGCAATCTGACGCAATAACCCCTA 12600  
 V D I A V V T A G M A R A I Q V C Y G G 12600  
 CCCCACGAGCGGTTGACGATAGCTATGTGCGCGCGCCCAAGCCAGATTGACGACTG 12660  
 V G G V G N V I A I D G P G L G S Q L V 12660  
 CCTGTCAGCGCTGTCACAGCATCCGCGACCAAGCCAGATGCGAGCGAAGCCCGA 12720  
 A Q Y P T T V A D A V V A V S A L S L G 12720  
 CATCGCGAGTTCGCGACTGTCGACCGGCAAGACCTCGAGCTGGCAGCCGGATATGCG 12780  
 V D R L R S E D V P V L G R A P V R I H 12780  
 TGGCGAAGCTTCATGATGATGTCGCGCATCTTTCGTTGCTACAGAGAGTGCCCT 12840  
 T A F G G D I D N G P M R E N S C L T G 12840  
 TGCCACGTTTTCAGGATGCGACTGCGCGCATTTGGAACATCGCGGACGATGACCGCG 12900  
 K G R K C P D C E G C Q F M A P V I V A 12900  
 GACGCATCCACTCGTCGGCGCTTACCAGCGCCACCAATGCGCGCTGATTTCATGGC 12960  
 R R M W E D A G K G A A V V H G S I E H 12960  
 CAAGCGCAATGGCAGCGGATGATTGTGCGTACCCCATCGTAGTAAACCGAGATCGG 13020  
 G L T L P L P H N T R V G D Y Y F G L D 13020  
 TGTGACAGACGCGCGAGCGCGCTTCTGATAACGACTCGCGCGCTCAGGAGCGCGCG 13080  
 T H C V G C G A V E I V V E G P G P A G 13080  
 GGTGAAACATTCCTGTCATAGGCTGGCGAGCGCTTTCATCACCAGCGATATGCTT 13140  
 P D F L E R E M P Q G V A K M V W R Y A 13140  
 GAATCGCCATGAAAGACCTCCACAAATAGTGTGGTAGGATGTTGAATATCCAAAAA 13200  
 CTTCTGGAGGTGTTTATGATCAACCGATCCTACAACTATAGGGTTTT 13200  
 O I A 13200  
 mbdX 13200  
 AACACAGCGCGCTTCCCTCAGCGCGCGCGGATTCCTTCTGCTGCTCCCGCTAG 13260  
 TTGTGTCGGCGAAGGGGAGTGCCCGCGCGCGCT 13260  
 \* K A K D D G Y 13260  
 ATGTAGAAACCTTCCCGGACTTCTTCCCGCATCGCCAGCTCGTACATCTCTTCAGA 13320  
 I Y F G K G S K K G W E G R E Y M E K L 13320  
 AGCGGCTTAGGTTTGGCGGATTCGACGCTGCTCTCTTATTCATTCATAGCGGAGA 13380  
 L R N P K A S E V S T E E Y E D M R A 13380  
 TACGACACGCTGATTCCGGTGTATCGAGAGCGCGAGGGCGCCATCGGGTGCCCAAGC 13440  
 V S V D I G T T D L L R L P G M P H G L 13440  
 orf4 F1 13440  
 CCTTGGTCAGGCAAGATCGATGCTCGCGCGAGCGTAACCTCTCTGATAGAGCTG 13500  
 G K T V A L D I D E A S A Y G E E Y L S 13500  
 ACCGCTCAGCGTCAGCGCGCGAAGATGCGGTTGACGATGAACCCCGGGATTTCTCTG 13560  
 V A E R T L A R F I R N V I F G P I E K 13560  
 CGCAGCACACCGGGTCTTTCGATGCTCGCGCAAACTGACACTCTTCAATGATC 13620  
 R L V V P T K G I S R C F A L V E E I I 13620  
 TCTGCGGCAAGCGGATGCACTACGACCTCCACTAGTTCATCAGGATGCGCGGTTG 13680  
 E A P V A P H V V V E V L E M V L A P N 13680  
 AAGAAATGATGTTAAGCACTCGCTCGGTCGCGGCTGACTCTGCAAGCGTGAGCCC 13740  
 F F H : N L V R Q P R A T V G A L R S G 13740  
 CGGATATTCAGCTGTTGGTGCCGAAATCGTTCGCGCGGCAAAAGTCATGATGATG 13800  
 R I N S S N T G F I T Q P P C L R D L T 13800  
 CGGAACAGTTCAGCTTCGGTTCAATTTTCGACGATGCTTCGATTATCAGATCAGCA 13860  
 R F L E A K P E F K E V I A E I L D A 13860  
 TCGCGGCAAGCGCGCAAGTCCGCGCGCAATCGAGATTGCGAGCGCGCTAGCCCTGCG 13920  
 D A A A A L D P A L D L N G L A T A R Q 13920  
 TCGCTGCTGATGCGCCCTTGGCGACGCGCTTGTCAAATGCTCTGCAAGAGTCCGCC 13980  
 E S S I R G K A V R K D L H E R V F D A 13980  
 GCCTGCTCCAGACTTCTCTGCGGCTGCTGTTGATGACCGTTTTCAGGCGCTGATGCG 14040  
 A Q E L S E K R S D N L V T K L G S L A 14040  
 CACTGACGCGTATCTGCGCCCATGCGCCCTGCGCGGATGACGCGATCTTTCATG 14100  
 C Q L A I Q R G M A G A G I V A I K E 14100  
 orf4 14100  
 ACCTTATCTCTCAAGAGTGGCGCGCTTGGCGCGCAATTTGGGAGACGCTTCCCTG 14160  
 TGGAAATAGAG 14160  
 \* S H A P K R G A F Q S V G E K 14160  
 CGTTCCTTCGCTGCTAGCAACCATTTGATATGTCGATATCGAAGCACTCGGAATGCTCC 14220  
 R E K A A Y C G N S I D I D F S E S H E 14220  
 ATATCGAGCGCATGATCCATGACGCGCTTGGCAGCCCGGACGCCACTTGGAGCTTGCC 14280  
 M D L A H D M C R K A G R V A V Q V N G 14280  
 CGGATGCAITTCGCCCATTTCCAGCGCTGCGGATCATGCTTCTCGCGGAGACGATACGG 14340  
 R I C Q A M E L A Q P M L E E G S V I R 14340  
 TTAATCACCCCAITTCGCTCGCGCGACCGGTCGAAGGTGATGCGTCAGCAATCAGT 14400  
 N I V G M R E A A V A D F T S A T L I L 14400  
 TCCTTAGCTCGCGAGCGCGATCAACTTCGGCAGCTTGGCGCACCCCGCGCGCTGGG 14460  
 E K A R A A G I L K P L K R C G G A A P 14460  
 ATCAAAACCCATTTACCTCAGGCAAAACGAAGTTCGAGCGCGCGCTGGCGAATATCAGG 14520  
 I L G W K V E P L G F T S R P T A F I L 14520  
 TCGCAGGCGAGTGCATTTGCAAAACCCCGCGCAAGCAATGCGCATGACACCGCGATG 14580  
 D C A L A I E F G G A L C H G D V V A I 14580  
 GACGCTTGGCTTGGCTCAAACTCGCTGTACATCGGAACATCTCTTCAGGCGCAAG 14640  
 S P K R K A E F E S Y M P F M E E L R L 14640  
 ACGGCGCTTCTCTGCTCGCTCAGGCTGCGCTCTCTGAGGTCGATGCGGACACAAAAA 14700  
 V A A E E D S L T Q R E K L D I G V C F 14700

GCCTTGCCGCGCCGACGACGACGATGATCAGACGCTCGTCTCCACGTCC 14760  
A K G G S G A V I I V D V A E D S E V D 14760

CGAATCGCATCGCGAGCTTGGCCACCATCGCGGATTGATGGCTTCATGGCTCAGGG 14820  
R I A D R L K R V M A R N I A N M A E P 14820

CGATTGAGCGTCAGCATCGGATTCGCTCGCTTTTTCAGCAGGATTCGTTGGC 14880  
R N L T V I A I G D S R K K L V I E N A 14880

ATGGCCGTCCTCAAGATTTCGCGCGGATCAGATGGCTGTGGTACCCCGCCGCCACC 14940  
CCGGCAGGGT \* S E R R I V I A T T V G G G G 14940

**orf3**  
GCAGATCGACGCTAGCCCAATTTCGGCTTCGCGCTGCAATATGTTGCCGAGCGCAT 15000  
C I S A V G L E G N E R Q L I N G L T M 15000

TAACAGCCGTGCACCGGACATACCTCGGGTGGCTGAGTGCATCGCCCCCGTACAC 15060  
L L R A G S M G T P H S L A I A G G Y V 15060

GTTAACTTGGCTCGGTCGCCGAGGACGCGCTGTTTCGCGAGCATCTGCGCAGGAA 15120  
N V K A R D W R L V R E N A L M Q A A F 15120

TGCTCTGGTCACTCAATGAAGTCAATGCTGCTCAGGCTCATGCTGCTCTTCAACAC 15180  
A E N V E I F D I D S L T M G A K K L V 15180

CATGGGAATCGCAAGACCGGGCCATCGCCCATGTGAGCAGGCTCTACTGCACTTCGCG 15240  
M P I A L G F G D G M H A P E V A T Q A 15240

CGACGCCACGAGGAAAAATGCGGGGCGTCCAGGAATTGGCATAGCGCGCTGGT 15300  
S A V L S F M P P R G L F K A M A R T T 15300

CAGCAGATTGCGCAAGGCCATCGCCCATGCTGAGGCGTTCGCTGCGTCACTGCGC 15360  
L V I A C A G D G M S C A N G A T V S G 15360

ATCTTCTTGAGACCGGTTTGAGCTTCGCAAGCTCTCAAGCTGGTGTCTGGCCGAAT 15420  
D K K F V P K L K A L S E L S T D P R I 15420

CGCTCTGTCAGGAAAGCGTCATTTGCTCTGGCTTCGTGCGCGGCAACGTCAAGG 15480  
A E D L F L T M E D Q S R T A P L T V P 15480

AACGATCTCGCTCGGGTGAGCCCGCGCGCGCTTGGCGCTCCATCGTGGCAGGG 15540  
V I E S A T L G G R R A K A A G D H S A 15540

GAGCGCAACTCGTCCATTTCTCGCGGGTGATGCGCTACTTGGCCACAAGATTCCTCG 15600  
L A F E D M E E R T I G Y K A V L N E A 15600

CGTCATGCCATGCCAAGCGCACAGGGGATCGAGGATTCGCGCCAACTCGTCAAGCAG 15660  
T M G M G F G C L P D L T D A W G D L L 15660

GGCTTGTGTCAGCGAGCTTGAACCTTCCACGCGAGCTTCTTCAGCAAGTACGGCATGG 15720  
T K D G L K F G E W R V N K L L Y P M T 15720

GCTCATCGATTCCATCGCCCGGCGACAATGAATCGAGCATACCGCTGCCAAGCTCTG 15780  
S M S E M G G A V I F R A N G S G L E Q 15780

GGCGCGGAGCATCGGATTTTCATGCTGAGGGGAGGCGCATATTGATGTGAAGGAAG 15840  
A A L M V S K M G S P C A M N V T F S P 15840

CGCTTCAACCGGGATCGCGCTTACCGCGCGGTGCGCGCAGGATGGGACATTTCC 15900  
A E V P I G G K V A A T R A P N P G N G 15900

GGCTGCGCGAGTTGGCAAGATCACTGGTCAATCTGATCGGAGGCGAGTGGCGCAG 15960  
A Q R C N A F I L Q D I Q D S P L A A R 15960

CTCGAGAGCCGCGGAATAGCATCGCACCCAGTTCCTCATACAGGAATTCGCGCAAGCT 16020  
E L A A R I A I A G L E W V P V E R L S 16020

GCGCGCAAACTGCCAAGCGCGGTGCGAGCGCGCTGATTGCAACAATCGTTTTCGCT 16080  
G G F S G L P T R A A S I A V I D N E S 16080

GGTCGTCATTTCCGTTTTCGCGTACAGCCCATACAGCGCGCAGGTTCCCGTGCAGGA 16140  
T T \* L G Y V A A A N G H L 16140

**orf2**  
TCCTTGCGCCACCTTTTCGCTCAGACGAGGTCCTTCTTGATGATGCAATGGAATCGC 16200  
I K Q A V K E S L G L D N K I C A I S E 16200

TATGCAAGACGGCGGGTAATTCGTCCTGATGACCTTGTCTGGCGCGGGTCTTCA 16260  
S H L V A P Y N T G Y I V K N Q G R T K 16260

TGAAGTGGATCAGGTTGGCTCGAGATATTGGGATGGTGTGATCGATGCCAGATAGA 16320  
M F H I L T P E L Y K P H H A D I G L Y 16320

CGTTCTCGTCTTCCAGGCGAGGATCATCTCTCGTCCAAGGCCATCCCGTATGGG 16380  
V N E H K W A L S I M E E T W P W G T H 16380

CGCCGATCAGCTTCAGCTCGGAAAAATCAAGCGCAGATGTCAGGATAGATCGGACGCC 16440  
A G I L K L E P F D L A V I D L Y I P R 16440

CCAATTCTGTCGCGATATGCTCGCGCAATGACCCACCTGATGACACCGGAATACCCA 16500  
G L E N P M H E A S H G V Q M S V P I G 16500

GCTCGACGATTTGGCGTACAAGGGTAGTAGGCGATGTTTCAGAGGAATGCCAAAGC 16560  
L E V C K A Y L P Y Y L R D N L P I G F 16560

CGTAAGTATGGATGATAGACGCCCTTGAACCGGAATCTTTCAGGCGCGCTCCACCTGC 16620  
G Y T H I Y V G K F G F E K V A R E V R 16620

GTACGCTTTCCAAATTTCTGCGGGGATGAACCGCAGGCTACCAGGCGATCCGGAT 16680  
R V S E L K Q L P N F G C L G V L R D P 16680

ATTGACTGACTACGGATGCATTCCTCTCAGTGATGTCCAGACCATGGTCTTTTCT 16740  
Y Q S V V A H V E E E T I D W V M T K K 16740

GATAGGACATCATGCGGATCGCGGTATGAACGCTTGTGAGACCTGCCTCATCCATCA 16800  
Q Y S M M R I A P I F A K D L G A E D M F5 16800

TGGCAATGAACTCGCGACGGACTTCGCTGGATGCGCTCTTCCATCCGCGACCACTGA 16860  
M A I F E G V S K G Q I R E E M R W W K F5 16860

TGAGTCGTAGCATTTTCGCGTTCCTATACCACCACTTATCAATGGCTTCCGAGTGAAC 16920  
I L R L M E P Q G Y W W K D I A E S T F F5 16920

**orf1** R1  
GATTCAGTGAAATCGATTCGCTGTTTCTCCCTCGGTAAACCGGACCAATTTCTGTA 16980  
L N C H F D I A CAAAAGGGAGGCAATGGCGCTGTTAAAGCAAT 16980

**orf1**  
TCGACGGACACGCTGCTCGTTTCGCGAGGTCAACGTATCCCCCGCATGCACGAGGTAA 17040  
AGTGCCTGTGCGAGCAGCAAGCGCTCAGTTGAGTAGGGGCGTATGCTGCTCCGATT 17040

AGTGTCTCGCGCAATGCTTCTTTCGTATACATACAGTGGTGTCTTGTCAACGTA 17100  
TCACGAGCGCGGTACGGAAGACGATATGATATGTCAGCCAAACAGAACAGTTGAT 17100

CAGTCCCATTTTATTACACCACTAACGATGCGCTCAACACGTGCGCCCCCTCCGTC 17160  
GTCAAGGTAAATAATGTTGTGGATTGCTACGCGAGTTGGTGACGCGGGGAGGCGAG 17160

GGAATCTGCTCGCGTAGCAGTTCCAGCTCCGCTACGGCGCGGACCAAGGTGGATTCT 17220  
CTTGACGAGCGCATGTCGAAGGTGAGGCGATGCGCGCGCTGGTTCAGCTTAAGA 17220

CCACTTCAGCGGGCAATGAACAAACCAAGAACCAACAGTTCGCGCTCACCTCGCTG 17280  
GGTGAAGTCGCGCTTACTTGTGTGGTCTTGTGTGCTTGAACGCGAGTGGAGCGGAC 17280

CTTAACGAACACAGCTACAGAATCGCGAGCACTTCTTACATCTGACAGTTTTCGCT 17340  
GAATGCTGTGTGATGCTTGTAGCGCTCGTGAAGAAATGTAGGACGTGTCAAAAGCGA 17340

TAAGGCCCTAAGATCGAGCGGCTTCGTTGCAACCTCGAAACCTAGTTCAGGTAAAGATC 17400  
ATTCCGGGATTTAGCTGCGCGAGCAAGCTTGGAGCTTGGATCAAGTCCATCTTAG 17400

AGTGATCTGACGAGCTGGGATCCATTAGCGTTACAACGCCATTCCAGCCTGCTCTCT 17460  
TCATAGACTGCTGACCTAGGTAAATCGAATGTTGCGGTAAAGGTGCGGACAGGAA 17460

GAGCCCAACTCTACAGACAAACGACGCGGAGCAATTCGCGGTGGGTGGTGACCC 17520  
CTCGGGTTGATGTCGTGTTGCTGCGCTCTTGAACGGGACCCACGACCGTGGG 17520

ACCAAGCCGCTTCGCTGTCGCGGTGACGAGCAACAGAACCTTTTTCAGCGCTCGGC 17580  
TGTTTCGGCGAGGCGCAGGCGCACTGCTGTTGTTCTTGAA \* A A R 17580

GATCGGCAACCGAACCTCTCAGCTTCTTCAACGAATGTGACCAAGGTGGCGCAACCA 17640  
R D A G S G R L K K V R I H G L I A C G 17640

GCGCGCGGTAACTGCGGATGTCACTTGGCGCAGCTTCGCTCCAAATGAGCTCAT 17700  
L A A T F O P M D G P A V N A D L N L E 17700

**mbdN** F1  
CGCGAATCGCTTGGCCATCACGCCCCAGCGCATATTCACCGACCAAGGTAATTTGAG 17760  
D R I A K A M V G W R M I G G V L T I Q 17760

GCTCAACATTGATACGCTTCAGCACTGCACACTGCGCTTGGTCAGGACATGCCCGCG 17820  
P E V N I R K L L Q V S R K T L S M G A 17820

CGTACATGATGCTTCGGCGGCGACGCTGTTGCTCAGTGATGATAACCTCCGACTCGG 17880  
G Y M I D E P P V S N S L H N I V E S E 17880

CAACACGGTACAAACCCCGAAATGGAGGAGCTTCTTGGCGTGTTCATAGTCCGT 17940  
A F V T C V G S I S A A E K A S N L L G 17940

CGATCGCGCGGTGTCATAGCCCATATAACGACGCTCTTTCAAGAAACATCGCGGTAC 18000  
D I G A T D Y G M Y R V T K E L F M G T 18000

CCGATGCGCACTTGTGCTTCAGGCGAAAGGTTGAACCTTATGAAACCGTCAAGCGAC 18060  
G S A C K D N L R F T R V K H F G D L R 18060

TCGCTTCTAGTGTGCGCACCAATGTCAAGCACTGTACGCGTCTCAGGAAACAGAAAA 18120  
S A K M T Q G G I D L V T R T E P F L F 18120

CCGACCCCGGCGCGGTGCGGTCAAATCTGTAACCTGCAAGTCCGACCGGAATACTGAT 18180  
V A G R A T A T L D T V Q L D R G S Y Q 18180

AGCGACCAATCAACAGTGGTAATGCAATAGGCCAGATCGCGCTTATTGATCTTGTGCT 18240  
Y R G Y G T T I C Y A L D R K N I K A Q 18240

CGCGCGCTCGTTGACCAACAGTTCGCGAGTTCCTCGATCGGCGCTGTGCGGCTCA 18300  
E A T E N V V L E A T G Q L D A G T P R 18300

TATGACGGGTACAACATTCGAGTCTTCGTCAGCAGCAGGCGCTTTATATACGTGAAC 18360  
M H R A V V N S D E D L V L G K I Y T S 18360

CGATATCACACCAATGATAGACCATAGTTCAAGCTTCCTGTGTGCGGACTTCTGCG 18420  
G I D V G I T Y V TCA \* A E Q T A S K E 18420

**mbdP**

CGGCTCGAAATGCCAGGCGAAAGAGCGAGCCCCAGTCCCGCATGAAATGGCTG 18480  
G A Q L S G L A F L A A G L A G M F H S 18480

CGTCGTGACGTTTCATTTTCAGGCTTTTCTCCAGCGCTTATCATGCGGACAT 18540  
D D S V N L K M E L K E E L A K I M G V 18540

TTTGGCCACCCACCAAGTGAAGTGATCTCGAGGCAATGCTACCGCGCGAGCAAGC 18600  
N K A V G G T F T I E S A I G V R R L L 18600

CGATGGCAGCTGCGGATAGATGATGACGCCCCACAGAATGCTTCACCTCTTGC 18660  
G I A R A A I S Q H V G W L I D E V K K 18660

CTTTCCAGCCATGACAGACCTCGGCTTCGGCAAAACAGTACACGTGGTGGAGTGC 18720  
G K G L W S L V E A E A F V T C T T S I 18720

GGACAGGCTTCTCGGACTTGAGCGAAACCTGACCTAGCTCTCCAAGCGGAATGCGTAACG 18780  
R V P K E S K L S V Q G L E G L P I R L 18780

CATCGGCGCGGACCCAAAAACCGCGGTCACGCGCGCATTTGTCTGTCATGCAAA 18840  
A D A A A G L F R G T G A A C K D N M C 18840

AATCAGTAATCTCCCATTTGGGGCCACCGGATCGCTTGTGTCTGCGCCCGCATGT 18900  
F D T I E G N P A V R I A K T D Q G G M 18900

CAATCAGCTGTGCGTACCGGAAACATGTGGACGCCCGCTCGGTGGCACGAGATT 18960  
D I V T O T G P F M H S A G R G H C S I 18960

CGGTACCTGGCGATCACCAGGTTACCTGTAGCGGCATACCGGTCCGATCACAT 19020  
E T V Q R D G F T V K Y R G Y G T G I V 19020

ACCCGACGTGCGACCGTTAAGCTTGCCTGCAAGCGCTGATCAAGCGGTATGTG 19080  
Y G V H S R K L K A S A L A Q D F A N H 19080

CTGCGTGATGACATCGGACCTGTAAAGATCAGGCGCGGCAACAAATTTCTGATCCT 19140  
A A C I V D A G T F I L A R G V I E Q D 19140

CGTTTAGGATAACCGCTTGGTGTGGTGAACGACGCTCCACGCCACCTGTGTATTCA 19200  
E N L I V A K T Q T S G V D V G G T Y K 19200

TGCTGTGTTCTCCGCTGCGATCAATCGAATCATGTGTTTCAACGAAGTCTCTAGTT 19260  
CGAACAAAGAGGCGAGCGT \* D F M I N E V F T E L 19260

**mbdQ**  
GGATCGCCAACTGTCGAAGTATTCTGATTTCTCTGAAATCTGAAATGAAATAGGGGA 19320  
Q I A L Q D F T N Q N E E F E S I F Y P 19320

TTTAGCTCTCTCAAGCTTCAAGATCGGACCTGTTCTCTAGACTGGCTCGCACA 19380  
I K A E L A K S Y A V Q E E L G P E C 19380

TCCTGCGCAAGCAAGGATCACCGTTTACGATCAGCGTTGCGCACGCTTCTAGAAGCA 19440  
M K A S A L I V T E A D A N R V R E L L 19440

TGTGCTCTCCGCTTGCCTGATCGTGTGCTACCGGCTATAGGACGAGCGATGATAT 19500  
M H E K P K R Q D H Q V P S Y S S R D I 19500

ATGCATCAGCCAAATCGGCAAGGACATCCTGAGTCGACCGCTCTCGACAATGAAAC 19560  
Y A D A L D A L A D G S D V V D E V I F 19560

GAAGCCGATAAAGCGTCTGATCAGACATAGCATGAGCGGTGATGGTTGAAGCA 19620  
R L G I F V D D D V V Y C S R T I T Q L 19620

GGTCGAACGGCGGGTTTCGAGAACCCCGCTCAAGCAGACCGCATTTTGTCTGCC 19680  
L D F P P T E C F G G E L V V R M K D Q 19680

GACTCGCGACGATCTTTGATCATCGGAATAACCGCTTCCAACAAATTCGAATAATCAG 19740  
R S A S R D K I M P I V A E L L E V F E 19740

ACCGCGGAGGATACCTGCCAGGCGGATAGGCGCATCGATCTCCGACCCAGAGCC 19800  
S R P L I G A L G V L A M S E D A G L L 19800

ATGGTGATTTCTTGCGAATGACGTAGAGTCCGCGATGAGACGGCGCAATGGTTATAGA 19860  
W P Q N K R I V Y L D R M L R R S H N Y 19860

GATTGATCGATGCGCGAGTCTCTGTTCAAGTAACTTTCGCGCCAGCAGCAATTCGATAT 19920  
L N I S A R L E Q E T V K R G A V S E I 19920

CTCCAAGCAAGCGTCTGTAATCATTCGCGAGATAGCTCTCGAATGCTTGAAGTTCGGGT 19980  
D G L L R R Y E N A L Y S K S H K S N P 19980

TCGCGGCAAGTACAAAATCTGGCATTTGATGCAAAATTCGCCCCAAATCGGTGCGA 20040  
N Q P L Y L I Q C K Y D F N R G W I P A 20040

GGTTGCGTGGCGATCGAGATCGGGTGGGTAACAAACAGATCCAGCTCAATGTCCCTTG 20100  
L N R A A D C I P H T V F L D L E I D R 20100

TAAGCGCAATTCGAGGAAGTCTTGATGATAGAGACAGATATGAACCGAAATGAGACT 20160  
T L A I D L S T K I I S C L Y S G F H S 20160

CGGATTCATTACCATCTGCTGCGCACCGGATGCGTACGGGCAATATCCAGCGCGGT 20220  
E S E N G D T Q A G R I R V P L L G A A 20220

GGCGATCTCTTCGGGAAATACACCTGAAAGTGACGATGACACGGCGCGCTCTGCAC 20280  
H A I E E P F Y V Q F H G I V R G G D A 20280

GCCAGGCTTTGACGTTGGGATATCGGGATCTCGCACTACGACAGAGGTGGAAGA 20340  
R W A K V T P Y A P D E V L E R C L D F 20340

TTTCTTGAGAGGCTTACCTCCCAACCGTGAAGTATTCTTTCGCTTACTACTCCA 20400  
I E K L P K G E W G T F Y K K A \* ACTGATGAGGT 20400

**mbdN**  
TTTCTGTTAGGCGGACCGCTGTGTGCTGGGACGGGAAATGAGACCTTCGAAAAA 20460  
AAAGAGAC \* A S A T Q Q Q R R S I L G E F F 20460

GGCATCAACGCGATTCTCATCGGCGCTTCGCCACCAATCGGATCAACAGATCGGA 20520  
A D V R N R M P A E A V V D P D V L D S 20520

CTCGATAAATAGGTCGGCAGTCCCATTTCTGTCGCAACATCGCGCATGTCCGCGT 20580  
E I F L T P L G M E N A V I R R M D A Q 20580

GCCGTTAGAAACGTTACGACAACTTTCGCGGATGGAAGAACTACGCGTCAAGCCGAG 20640  
G T S V T R C S K V P H F V V G D L G L 20640

CTCCGAGCCAGTTTCTTAGTTATCGGACTCGTGAACACGCTATCGAACCAGCAGC 20700  
E P A L K K L N D S E H F V S D S G S A 20700

ATGTCATGATCAGTTGCCCTTCGCGTAGCTGTGATCGGGTCTGAGATCGTACTGATA 20760  
H M I L Q G E A Y S D I P D N L D Y Q Y 20760

ACCGGTCAACGACCGAGTTCGAGGCGAAATCGAGGTACGACGAATACGAATACGCCGCC 20820  
G T L A G T S A F D L Y S S Y V F V G G 20820

CCACCTTGAGAACATCTCATTAAATTCGCGATAGATTGATAGCAAGGTGTGCGCAGAG 20880  
W R S F M E N F Q R Y I P Y C P T G V L 20880

AGCGAGACGAAAGCTCTGCTTCATCGGACGCTACCTTCGGTGTCTTATCCAGCGGCC 20940  
A L R F T Q K M P V T G E T S K D L A G 20940

AATACCATGCGGACGCGATTTCTAGCTCTTCGACAGATCTTGAAGTACTTACTGGC 21000  
I G H A V R Y E L E E V L D K F Y K S A 21000

AACCTCGGTGCCACGACGCGTTCGCAACACCCATGTAATATTCCTCCGTCACGCG 21060  
V E T G R L A N A V G M Y I N G D T L A 21060

ATTGAACACGCGAGTTTGTCTGTTGAGTTCGAGAACCCGCTTCAACAGCGTTTAC 21120  
N F V A P K N R N L E L V R K L G A N V 21120

GTCAATCGAAACCGGAGATCTGTGAAACTGTGATGCTGAAATTTCTGCTGTAAT 21180  
D N S F A L I Q R P K D I D F K K G T I 21180

TCTCTCAAAACGCTAATGGCTTCTCGATCTGCCCTTAAGGTAGGCTTTTCTGATCT 21240  
R E C V S I A E E I Q G K L Y A K E Y E 21240

GAATTTCTGCGTTCCGCTTTCGGCTTTTCTCCGCTGAGCGCTCATCGGATAATCGAG 21300  
F K Q T G R K P K E G A S R T M P Y D L 21300

ATTAATCATCGGACAGTCATAGTTCGCTCCGATCTCACCCCATCTTATAATGTATT 21360  
N I M P C D Y T R E W I E G W K I F T N 21360

GCAGTAGTTATGATCATCGCGATTTTGGTTTCGGGATTTTCCCATCGGATCTCGCC 21420  
C Y N N I M G I K P K P I K G M P H E G 21420

ATTTCGGCGCTGAAGTGTACCGGATTTTCATATCCGAGATCTGACGCGAATAGCC 21480  
N R R O L A V G I K V Y G C I D P S Y G 21480

5' bermut (EcoRI)  
GTAATCTCCGCGTATCGATATAGTCGCGGGAACATTTGAAACGCGGCTCGACAGA 21540  
Y D E A D D I Y D R S V N R F A T Q L S 21540

ATTGATTTCGGGAAAGTCGAGGAATATCGAAGTTCGGAAGATTTCGATTACATTC 21600  
N I E P F T A P I D F T R L I E I V N G 21600

GGCGATAAAACAGTAGGCGCTCCCTCTCTCGCTTGGCGACCTCGGTCAAACTGTGCA 21660  
A I F C Y A A G E G R K A V E T L S D F 21660

**hcrB R2**  
CCACTTCGGAACAAACGTGCGCATCTGACCTCTGTCGCAAGGACATTTTCCTTC 21720  
W E R F L R A G D Y V G R G V L V K G E 21720

**Pmbd1 Kpn1 5'/Pmbd0 Xba1 3' CIB +1P<sub>hcr</sub>3' Pdiv0 EcoRI 3'.2**  
GCCGTCGTCTGGTCTGTAAGTCAATTCAGCTTCTCTCTCAATTTGTTTAAAGGAA 21780  
G T T O T A L T \* AACTGCAAGGAGGAGTGAACAAATACCTTT 21780

**mbdO**  
CGCGCTTCGCGCTTTCGCGCTTCTCTCTCTGATACCGTCGAGCATCGAGAGGC 21840  
GGCGAAGCGGCGGAAAGCGCAAGTGAAGGCGAACTATGGCAGTCTCGTAGCTCTCG 21840

GCAGGCTCCGCGGCTCTTCCATCCGCAACATACGAGTCCGCGATATCTAACGCA 21900  
CGTCGAGGCGCGGAGAGGCTGAGGCGGTGTGATGTCGAGCGGTATAGATTGTGCT 21900

**Pmbd0 F1**  
AAATCTGTTGCTGTCAACCGCATTTAGTCCGCTGTAGGAGCACATAAAGTCTCGGA 21960  
TTAGAACCAACGACAGTTGGCGTAATACCGCGACATCCCTCGTATTGACAGGCTT 21960

**Interno Pdiv0 B1 Scal 5'.2**  
CTGTAGCACGTGCTGATCAACGCTAGAGACTACGGAAGATGAGTCTGTGAGAC 22020  
GAACATCGTCACAGACTAGTGTGATCTCTCTAGTCTCTCTACCGACCTCTG 22020

TTACGTAATTCATCTCTCGCATGCGCGCTCCATGCTCTCAAGGTCCTTTCCCAT 22080  
AATGGCATTATGTGAGGAGCGGTACGCGGAGGTACGAGAGTTTCAGGAAAGGGTA 22080

**Interno Pdiv0 Scal 5'.2**



TTCTCCCTCCGATTTCGAGGCTTCCTGATCAGTCGTGTGACATACACAGCCAGCCGG 22140  
AAAGGAGGAGGAGGCTAAAGCTCCAGAAAGGATAGTCAGCAACTGTGTATGTCGTCGCGC 22140  
TATATGTTAGCCGATGTGGGACCGGGGCTGTGACAGCTTTTGTGTGGCGAGCTCGCGGA 22200  
ATATACCACTGGCGTACACCCCTGGCGCCGACAGTCTGGAAAAACACCGCTCGAGCGCT 22200  
Pmbd1 F1  
AACGCCGTTTTCGCAATGACATGAATTTCCCGGACATAGTCCCGCGCGAGGCGCGCG 22260  
TTGCGGCAAAAGGCGTTACTGACTTAAAGGGGGTGTATACAGCGCGCGCTCCCGCGCG 22260  
mbd1 Pdiv>B1 EcoRI 3'  
T A Q K K T S R R  
GTGCCCCCTTTCATCGTCCAGGAGGAGAG 22320  
CAGCGGCACTAGAGGCTCTGCTCTACTGAGCTGTCTTTTGTCTCGCGAGCC 22320  
CTB +1P<sub>2</sub>13 Pmbd0 KpnI 5' / Pmbd1 XbaI 3'  
D F L K A T G I I T A G T L L P A H F A  
CTAAAGAGTTCCTGTGGCTTAATAGTGGCGCGCTGCGACGACGCGCGGTGAACCG 22380  
CTAAAGAGTTCCTGTGGCTTAATAGTGGCGCGCTGCGACGACGCGCGGTGAACCG 22380  
mbd1 R1  
I G N T A K I K V G L M L P Y T G T F A  
TAACCGTTATGCGGTTCATGTTCAACAGACCTACGAGGGAATGTGGCGGTGCAAGCG 22440  
TAACCGTTATGCGGTTCATGTTCAACAGACCTACGAGGGAATGTGGCGGTGCAAGCG 22440  
P P G N S I T N A F K L Y I A E Q G G R  
GGTGGCCGTTATCGTAGTGGTGGCAAAATCAACATGTAGCGCTTGTCCGCGCTCC 22500  
mbd1mut EcoRI 5'  
L A G R E V E Y V V V D D E S D P A K A  
GACCGCGCGCGCTCCAACCTCATGCAACATCAGCTGTCTCAGCGTAGGCGATTCGCG 22560  
GACCGCGCGCGCTCCAACCTCATGCAACATCAGCTGTCTCAGCGTAGGCGATTCGCG 22560  
P E N T H R L I V R D K V D F L V G T V  
GGGCTCTTATGAGTGGCGAGTAGCAGCAGCTGTCCAGCTAAGAACACCGCTTGGCAG 22620  
GGGCTCTTATGAGTGGCGAGTAGCAGCAGCTGTCCAGCTAAGAACACCGCTTGGCAG 22620  
H S G V A M G M V K V A R E A G T I T I  
GTAAGCCCGCAGCGGTACCGGTACCACTTCACCGCGCGCTTCGTCCGTCTAGTGGTAA 22680  
GTAAGCCCGCAGCGGTACCGGTACCACTTCACCGCGCGCTTCGTCCGTCTAGTGGTAA 22680  
I P N A G T D A A T G P M C A P N I F R  
TAAGCTTTCGCGCATGCGTGTGCTGCGTACCGCGGTACACGCGCGGTGTAAAGGCA 22740  
TAAGCTTTCGCGCATGCGTGTGCTGCGTACCGCGGTACACGCGCGGTGTAAAGGCA 22740  
A S F S T Y O T A F P M G K V M V E R G  
CGGAGCAAGAGGTATATAGTCTGCGGAAGGGGTACCGCTTCAGTACCGCTTGCCTCT 22800  
CGGAGCAAGAGGTATATAGTCTGCGGAAGGGGTACCGCTTCAGTACCGCTTGCCTCT 22800  
H K R V A I I T W K Y A F G E E S A R A  
GTGTCGCGCAGCGGTAGTAGTACCTTCATCGCGAAGCGCTCTTAGCGTGTGCGGA 22860  
GTGTCGCGCAGCGGTAGTAGTACCTTCATCGCGAAGCGCTCTTAGCGTGTGCGGA 22860  
F K E G Y E A A G G K I V K E M F L P F  
AAGTTCCTTCGATCTTCGCGCGCGCGCTTCAGCAGTTCCTTCAAGGACGGAAG 22920  
AAGTTCCTTCGATCTTCGCGCGCGCGCTTCAGCAGTTCCTTCAAGGACGGAAG 22920  
P N V E F O A Y L T E I A A L K P D A V  
GGGTTGAGCTCAAGGTCCGATAGAGTGAATTTAGCGCGGAGTTTGGGCTGCGCAC 22980  
GGGTTGAGCTCAAGGTCCGATAGAGTGAATTTAGCGCGGAGTTTGGGCTGCGCAC 22980  
F V F F A G A G A V K F V K D Y A A A G  
AAGCATAAAGGACGACCGCGCGCTCATTTCAAGCAGTTCCTGATGCGCGCGCTCT 23040  
AAGCATAAAGGACGACCGCGCGCTCATTTCAAGCAGTTCCTGATGCGCGCGCTCT 23040  
L K N T I P L Y G S G F L T D G T L A A  
CAGTTCCTTGTGTAAGGGAGAGTGAAGTCTAAGGAATGGTGCCTTGTGAGCGCG 23100  
CAGTTCCTTGTGTAAGGGAGAGTGAAGTCTAAGGAATGGTGCCTTGTGAGCGCG 23100  
Q G D S A E G V H T T L H Y A D D L G T  
GTTCCGTGATGCGCTCCTCAGGTATGTGCAACGTGATGCGCGCTGTAACCCCTGA 23160  
GTTCCGTGATGCGCTCCTCAGGTATGTGCAACGTGATGCGCGCTGTAACCCCTGA 23160  
P R D N A F R V A Y R K A Y G Y D P D V  
GGTGCCTGTTCAGAAAGCGCACCGGATGCTTCCGATGCTATGCTAGGCTGAC 23220  
GGTGCCTGTTCAGAAAGCGCACCGGATGCTTCCGATGCTATGCTAGGCTGAC 23220  
Y A V Q G Y D T A Q L L A A G L D P V K  
ATGCGCCAGCTCCCAATGCTGTGGCGGTTGACGACCGCGCACCGGAGCTGGGTAGTTC 23280  
ATGCGCCAGCTCCCAATGCTGTGGCGGTTGACGACCGCGCACCGGAGCTGGGTAGTTC 23280  
mbd1mut XbaI 3'  
G D A G A R A E I I A A M E K A T I D S  
CCGTCGCGCGCGCTCTGCGCTCTAGTAGCGCGGTACCTTTCCGGTGTAGCTGTG 23340  
CCGTCGCGCGCGCTCTGCGCTCTAGTAGCGCGGTACCTTTCCGGTGTAGCTGTG 23340  
P R G K F T M S R A H N P I Q D I Y L R  
GGTGCCTGTTCAGATGCTACAGTCTCGGTATTTGGGCTAGTCTCTGATAGTAGCG 23400  
GGTGCCTGTTCAGATGCTACAGTCTCGGTATTTGGGCTAGTCTCTGATAGTAGCG 23400  
K V E G G Q N R V V G I A A K A L A D P  
TTCCAGCTCCCCCGCTTGTGGCCACCACTTATCGCGGTTCGAGAGCGCTGGGC 23460  
TTCCAGCTCCCCCGCTTGTGGCCACCACTTATCGCGGTTCGAGAGCGCTGGGC 23460  
V R G C K M A \*  
CGCCATCACCCCGGATTCGATCCGCGCACGTGAGC 23520  
CATGCGCAAGCTTCTACGTAAGTGTAGTGGGCTAAGGCTAGGCGCGCTGCACTGC 23520  
CCCCCGCGCGCGCTGCGCGGGGCGCTUACCAAGGCTCCGTCCTCATCAAGGAT 23580  
GGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTGCTGAGGACGAGGATAGTTTCTTA 23580  
mbd2  
D V Y T F L I Q V L N G L O Y G L  
GCGCGAA  
CGCGCTTACCTACAGATGCTCAAGAGTATGTTGACTTACCCGAGTATACCCG 23640  
CGCGCTTACCTACAGATGCTCAAGAGTATGTTGACTTACCCGAGTATACCCG 23640  
L L F L V A S G L T I F G I M G I I N  
ATGACGACAAAGACCCGCTGCGCGAGTGTGATAGAAAGCGTATGATACCATAGT 23700  
ATGACGACAAAGACCCGCTGCGCGAGTGTGATAGAAAGCGTATGATACCATAGT 23700  
L A H G S F Y M I G A Y L A W A F A A A  
TGGAGCGGTACCTCGAAATGTATAGCGCGGATGAAAGTACCGCAAGCGAGCGC 23760  
TGGAGCGGTACCTCGAAATGTATAGCGCGGATGAAAGTACCGCAAGCGAGCGC 23760  
T G S L F S A I L L G L V V S T L I G V  
GCTGTCTGCGGACAGTACCGTAAAGAGACCCGAAACCATATTCATGGGACTATCCC 23820  
GCTGTCTGCGGACAGTACCGTAAAGAGACCCGAAACCATATTCATGGGACTATCCC 23820  
I L E W T V F R R L Y H R D H L Y Q V L  
ACTAGGAGTCACTGGCAAGGCGCGGAGTGGTGGCAGTGGTGGAGTGGTCCACA 23880  
ACTAGGAGTCACTGGCAAGGCGCGGAGTGGTGGCAGTGGTGGAGTGGTCCACA 23880  
L T F G L I M I F E E L R S M T F G D D  
ATGAGTGAAGGCTGAGTAGTATAGAAAGCTTCTCAAGCGGTGCTATGGAAGCACTAC 23940  
ATGAGTGAAGGCTGAGTAGTATAGAAAGCTTCTCAAGCGGTGCTATGGAAGCACTAC 23940

V H S V A I P A V F S A A I P L T D T L 24000  
TACAGTGTGCGACCGTTAGGGCGGCAAGTACAGCGCTAGGTGAGTGCCTGTGGG 24000  
S Y P V Y R L V I S A T C L V V A M L I 24060  
ATTGATAGGCGAGATAGCGACCACTAAGCGCTTGGACGGATCATCAGCGTACACT 24060  
Y W L I Q H T R L G M M I R A G A S N R 24120  
AGATGACGAGTAGGTGTGTGTCTGATCGTACTACTAGGCGCGCCAGTAGGTGG 24120  
E M V O V L G I D I K L V Y T L V F A L 24180  
CCCTTACAGGTTACGACCCCTAGCTGTAGTTTGGCAATGTGCGAACACAGCGAG 24180  
G L A L A A F A G M I A A P I S T V Y P 24240  
ACCCGAGCGGATCGCGGAAGCGCGCTACTAGCGCGCTGGATAGAGATGGCAATGG 24240  
N M G G Q I L I I S F V V V V V G G I G 24300  
GCTGTACCCCCCGCTAGGACTAGTAGGGAAGCAACCATCAGCAGCGCGCTAGC 24300  
S V K G T L L A A L M I G M A D T F G K F3 24360  
CGAGCGAGTCCCTGTGATGAACCGCGCTACTAACCTACCGGTGTGCAAAACGCT 24360  
I V L P Q I A S M S A Y L L M A A V L L 24420  
TCTAGCATATGGGTCTAGCGGTGTACAGCGTATGGAGATTACCGCGCAAGAG 24420  
mbd3  
W R P R G L F A V G G R \* T Q Q L R 24480  
ACACCGCGGGCTCCGAACAAACGACACCGCGCGCTACTGAGTTGTCAAGCT 24480  
R F F L F S A V A G L A I Y P L Y G G E 24540  
GCGAAGAAAGCAAAAGCGACACCGCGCGAGCTTAGTAGGAGATGCCCGCTC 24540  
F Y I O L L T K I M V M A V F A M S L D 24600  
AAGATATAGTCAAGACTGGTCTTAGTACCACTACGACAGCGGTACTCGGAGTG 24600  
L L V G Y A G L V S L G H A A F F G V A 24660  
GACAACCAACCGATGCGCGCGAAGCAGTGTGAGCGCAGTGTGCGCGTAAAGCAACAGCG 24660  
G Y V A A L L M P O Y E A G N V W L T L 24720  
CGATGCAACGTCGGAACGAATACGGGTGTATGCTCCGCGCTTACACACGAGTGGAC 24720  
P A A L C A A T L L A L V V G A L A L R 24780  
GGGCGCGGACACACCGCGGTGTATGAGCGCGAAGCAACCGCGAGACCGGACTCT 24780  
T S G V Y F I M V T L A L A Q M L Y Y F 24840  
TGACGCGGCATGAAGTAGTACCACTGCGACCGCAATCGGCTTACGAGATAATGAA 24840  
V H D A E F A G G S D G M L I M L K P E 24900  
CAGTGTCTGCTCTCAAGCGCGCGCTAGCTACGTAAGTAGTACAACTCGGCTT 24900  
A V I F G W K P F D L N S P A H F Y Y V 24960  
CGCCACTAAGCTTACCTTCGGGAAGCTGAGTTGTACGCGCGGTGAAGATGATGAC 24960  
V L A V M L G V Y F L L R A V L R S S F 25020  
CAAGACGTCACCTACGAACCTCAGATGAAAGACAAACCGCGACACGCTAGCTGAAA 25020  
G H A L A G I K S N E H R M R S L G F P 25080  
CCGGTCGGAACCGCTCGTGTAGTTCAGGTTGCTGTGGCGTACGCAAGCGCAAAAGC 25080  
V Y R Y K L A A F T L A G T V A G L A G 25140  
CAGATAGCAATGTTGAGCGCGGAAATGGAGCGCGGTGGACCGCGCAAGCGCGC 25140  
Y L G A L O F G F V N P E L L G W H Q S 25200  
ATAGACCGCGCGAGCTCAAGCGAAGCAGTGTGGCGCTCAACGACCCGACCGTGTGACG 25200  
G N V L M M V I L G G M G S L T G P V T 25260  
CCGTGACGAGTACTACCACTAGGACCGCGCTACCATCGAGTGTGCGCGGACGAGTGC 25260  
G A F T L V L L Q E F L T G L T K H W Q 25320  
CCTCGCAAGTGGGATCAGGCAAGTCTCAAGAAATGGCGGAGTGTTCGTAACGCTT 25320  
V L M G S F I V L V A L M L P H G L S G 25380  
CAGGACTACCCGCTGAAGTAGCAGCAACGCAACTACGAAGGGTACCGGACTACCG 25380  
F S L T R Y R L R A H T D T R T T P E K 25440  
AAAAGGAAATGTGCTATGGCTAACTCCCGCGTGTGGCTATGAGCTTGGTGTGCGCTTTC 25440  
D H V \* 25500  
CTGGTACAGACTTGGGTAAAGCGTGTGGCTCACTGGTTCGTGAAACCAACCGGAGC 25500  
S E P I L R T T E L T K H F G G L A 25560  
mbd4  
GCGTCACTGGTTCAGGGAGCTGAAATGCGCGCGCTTACGTGCGGACGAGCGGG 25560  
A V N Q V S L D F Y A G Q V H A L L G P 25620  
GTTACCCGCGCTTCAAGTGAAGTAGTGAAGAGAGCCCGCTAGATTTCGCTTCCG 25620  
N G A G K S T F I N L L S G D L K P S G 25680  
ACCTCTTCACTCGGACCGCGCCAGCGCTAGCTCCTGACAGGCGCTCTTTAAAGCGC 25680  
G E V S L A G C A I E G L S P E K I S R 25740  
GTACCCGACCCCGCTTGGATGGTCTTCTGCTTATAGAAAGGCGTAAATGCCATAAGCT 25740  
M G V G R T Y Q K T N I F P A F T V F E 25740

25800  
 25800  
 25860  
 25860  
 25920  
 25920  
 25980  
 25980  
 26040  
 26040  
 26100  
 26100  
 26160  
 26160  
 26220  
 26220  
 26280  
 26280  
 26340  
 26340  
 26400  
 26400  
 26460  
 26460  
 26520  
 26520  
 26580  
 26580  
 26640  
 26640  
 26700  
 26700  
 26760  
 26760  
 26820  
 26820  
 26880  
 26880  
 26940  
 26940  
 27000  
 27000  
 27060  
 27060  
 27120  
 27120  
 27180  
 27180  
 27240  
 27240  
 27300  
 27300  
 27360  
 27360  
 27420  
 27420  
 27480  
 27480  
 27540  
 27540  
 27600  
 27600  
 27660  
 27660  
 27720  
 27720  
 27780  
 27780  
 27840  
 27840  
 27900  
 27900  
 27960  
 27960  
 28020  
 28020  
 28080  
 28080  
 28140  
 28140  
 28200  
 28200  
 28260  
 28260  
 28320  
 28320  
 28380  
 28380  
 28440  
 28440  
 28500  
 28500  
 28560  
 28560  
 28620  
 28620  
 28680  
 28680  
 28740  
 28740  
 28800  
 28800  
 28860  
 28860  
 28920  
 28920  
 28980  
 28980  
 29040  
 29040  
 29100  
 29100  
 29160  
 29160  
 29220  
 29220  
 29280  
 29280  
 29340  
 29340  
 29400  
 29400

CTTGCGCGGGAACGACGGGTGACGGCGGGGGGTACGAAAGTGGAAGCGGTGCG  
 N A R L A A Q S R R P H A F H L F R H A  
 TGAGGGAACACCGCTTGGAACCTTGACGGCTCTTCCAGAACGTAACCGCTGACGT  
 L A C G D T L E L A E K V L A M G E L T  
 TGTGGCTCTTACTGTACCGTCTGATGACAGGTACCGCTCGTGGCTGAGCTTA  
 H R R N D M A A I L S H G E Q R Q L E I  
 GCGGTACCGCGAGCGGTGACTTGGGTCCACGATAACGAACCTACTTGGAAACCGGCTTA  
 A M A L A T E P C V L L L L D E P L A G M  
 CCCCCGTGCTCAGCGCGGTACACGCGCAACGAGTCTTGTAGCGTCTCTAGTGG  
 G A T E S A A M V R L L K K L A E D H A  
 CTAAATGACCACTTGTGCTACCTACGGCACAAACGCAAGGCTACGACCTGACA  
 I L L V E H D M A D V F A D V V T V  
 GTACCACTGCGGTGCTCAGACCTCAGCGCTCGGGGCCCTTAGGCACGCTCAGCGG  
 M V N S T V L E S G S P G A I R A S A A  
 mbd5  
 N H S L L E  
 GCAAGTCTTGGATAGAGCCAGCTCTCTCTACTCTCGGTACTTGGTGGCAACGAAC  
 V Q E A Y L G A E E D L L K K L A E D H A \* F2  
 A R G I H T Y Y G A S H I L R G I D F T  
 TTCGAGCGCTTAGTATGAATAACCGGATCAGTGTAGGAGGACCGTAACGAAAT  
 V R R G E T V G L M G R N G M G K T T L  
 GCCACGGCGCGCTCTGCCAGCAGATTACCGGCTTGGCGTACCCATTGTGTGCG  
 L K T L M G V V P S H K G E I R I N G H  
 ACAACTCTGCGACTACCCCGACGAGCGGTGTCCCGCTTAGGCTAGTGTGCG  
 V T T R S Q P C R I A R H G V A Y V P E  
 TGCAGTGATGGGCGAGGTGCGGACAGCTTAACGAGCGGTGCCGAGGTATGACGSGC  
 G K G I F F N L S V R E N L V M A A R P  
 TCCCCCGCTTAAAGGGATTGGAGGACGCGCTCTTAGAGCAGTACCGTGGGCG  
 G V G G R R D W T F E R A L K T F P R L  
 GGCCTGACCGCGCGCTGACCTGGAAGCTGCGCAGTGTCTTTGAAAGGGCGAG  
 G E R L G H G G G Q L S G G E Q Q M L T  
 AACCACTTCCCATCTGCTA/CCTGCTGCT/AAACCCCGCT/CTGCTGT/TAHACT  
 I G R A L M T N P D L L I L D E A T E G  
 GGTAGCGCGGTAACTACTGTTAGGCTGGACGAGTACGCTGCTGATGCTTC  
 mbd5 F1  
 L A P I C R E I W T V I G A I R D T G  
 CCAATCGCGGTAGTAGAGCGGCTCTAGACCTGACATTAACACGCTAGTCCCTGTGG  
 I A T I I V D K N F R A I S S I T D R N  
 CATAGCGGTGTAGTAGAGCTGTTCTTGAAGCGCGGTAGAGCAGTGTGCTAGCGT  
 V I L V K G N V V F E G D R E A L R S O  
 TACATTAGCACTTTCGTTGACCAACAGCTCCCGTGGCGCTCCCGATGCCAGCG  
 P E V L K N F L G V \* PmbdA\_ScaI 5'  
 GCGCCCGCCCAAGTTTCAATTATCT  
 TGGGCTTCACTATTTTAAAGAGCGCAAACTCCGGGCGGGTCAAAAGTAATAGA  
 Intergenic mbd5-mbdA KpnI 5'  
 CTAGTACCGCAAGAGCGCAAAAGATCTTATGCACTACTCCGGTATGACGCTCT  
 GATCAGTGGCGTTCTTCCCGGTTTGTAGATAACGTATGATAGCGCAATCATGAGAA  
 TTTGACCAATTGATCTACAGGGGAAACATGTTCCAGAAATTAACCATAGTGTCTG  
 AACTGGTTAACTAGATGTGCTCCCTTGTGTAACAGCTCTTAAAGTTGATACAGAGAC  
 CGTCTTGGAGCGCGAGCGCTTATGCGAGCGTTTGTGTCGCGAAGCATAGGGTCACTAT  
 GCGAGCACTTCCGGTTCGCGAAATCGGTGCGAAACGAGCGCTTCTAGTCCCACTGATA  
 mbdA HindIII 5' mbdA EcoRI 3'  
 GTTGATGCGCAITGAGGAACCGGCT  
 CAACCTAGCTTACTCTTGGCTGGTACGCTGTTACCGCATAATGGTTCGGTGTATC  
 Intergenic mbd5-mbdA XbaI 3'.2  
 P E L Q F P H T F N V A S A L I D R H L  
 CAGGCTCGACGTAAAGGTGTGGAAGTTACACCGTTACGGAACATAGTAGCGGTAG  
 D E G R G K K T A I L T V D E T V N Y E  
 ACCTGCTCCCTCGCCCTTTTCTGACGCTAGGAATGGCAGCTACTTGTACAGTTAATGC  
 T L V T N V N R Y G N A L K K I G L L A  
 TTGAGAGCAGTGTCTGCTGTTGGCTACGCTGTTGGAACTTTTATAGCAACGAGC  
 mbdA R2  
 G D R V L M V I K D A P E F Y Y V F W G  
 GCCCTTGGCCACGACTACAGTAGTCTTACGCGGCTTAAGATGATGACCAAGACCC  
 C I K T G I I P V P L N T M L T S E D Y  
 CTACGTAGTATTTGCCCTTAGTAGGGCCACGGGAAATGTGTGACGACTGATGCTTCTGA  
 K F I I A D S G A N V L V Y S E E F K D  
 TGTTCAGTAGTAACGGCTAAGCCGCGCTTACAGACCAACATAGGCTTCTCAAGTTTC

Q I T A A I M A E T P L O H V L P A R H  
 TGGTCTAGTGGCAGCTAGTACCGCTTGGAGGACGCTGCTAGATAATGGCGCGCAG  
 V A G S L A E L A R D E S P T L A A S P  
 TGCAACGGCTTCAGACGGCTTACCGCGCGCTACTCAGTGTGTGCGACCGGCTGAG  
 mbdAmut HindIII 5'.2  
 A A A D D D C F W L Y S S G T T G R P K  
 GCGACGAGCTCTACTGTACAAAAACGACATAAGGAGGCTTGGTACCGCGCGCT  
 G V V H A H R D I V A T S O L Y N V G I  
 TCCCTCACGAGTGGCGGTGGCGCTATAACAGCGGTGGTCACTGAGATTTGACGCTT  
 L G G N V S D I Y Y S I P R L F F A Y G  
 AAGAGCCACTTTGCACTCGCTATAGATAATGAGTACGGGTCCGAAAAGAGCGGATGC  
 L G C G M T F P L W V G G T A V L D A R  
 CTGACCCACGCGTACTGCAAGGGGAAACCCAGCGCGGTGCTGCTACGAACTGGCGG  
 R P L P P I T A E L F A R F K P T I F A  
 CAGCAGGGGACGGCTTAATGGCGCTCGAAAAGCGGGCTAAGTTCGGCTGTAAAAAG  
 A V P T Y F S A L L A S S L L K S E H V  
 GCGCGCAGCTGATGAAGAGCGTAACGACGCAAGTAGGCACTTACGCTGTGTGCG  
 V T L R R C V S G G E A L P E E L Q R R  
 ACCACTGCGACGAGCGCAAGGGCGCGCTTCGCAACGAGCTTCTTAACTGCTGCTG  
 W R Q I A P A P I T D G I G S T E A L H  
 CGACCTCGGTTAGCGTGGCGGTGGTGTGGCTACCGTAGCGAGCTGCTTCCGGAGG  
 I Y I S N T I D D I R P N S S G R A V P  
 TATAGATATAGTTTGTGTAGCTGTCTAAGCAGGGTTAAGGTGCGCAGCAGCTCAAG  
 G Y Q L R I I D E N G D A I L D D S P G  
 GSCCGATGGTTGACGCTTAATACTGCTTTTGGCTCTACGTTAAGAGCTGTCTGGGCG  
 R L L V K G P S V T R R Y W N N P A K T  
 CAGCGGACACCACTTCCCGGTAGCGCTGGGCGGATGACCTTGTAGGCGCTTTT  
 A S S I V D G W L D T G D T Y Y R D S D  
 GAGCTAGGAGCTAACAGCTACCGACCGAGCTATGGCGCTATGGTAAATGGCGCTATCGC  
 mbdAmut XbaI 3'.2  
 G Y Y Y Y C G R N D D M L K V G G I W V  
 TACCGATAAATGATGACGCTGCACTTACTGTACGAGTTTCAGCGCCCTTAGACCC  
 S P F E I E A A L I S H P D V L E A A V  
 ATAGAGTGAAGCTCTAGCTTCCCGGGACTAAGGGTACGGCTGCTAGCTTCCCGCGC  
 T G R A D D A G L I K P E A W I V L K I  
 ATTGGCCAGCCCGCTGCTACGCCAGAGTAGTTCGGGCTCCGTACCTAGCATGAGTTCT  
 A A Y A G E L L A E D I R T L C K T A L  
 AACCGCTATGCGGCTCTTACGAAACGCTCTTATAGGCTTGAGAGAGCTTCCGGCGG  
 A P Y K Y P R W I H F V D E L P K T A T  
 AGCGCGTATGTTTATAGGGGCTACCTAGGTAAACAACTACTCAACGGCTTCTCGGCT  
 G K I Q R F K L R N A A H D \* TCCCGCAGGCAAC  
 GACGCTTCTAGTTCGCAAACTCGAGTCTTACCGCGGCTACTAGTGGCTTCCGCTG  
 mbdA XbaI 3'  
 TCAACAGCAGCTCCACGAAACCCATCTTACGTAGCCACGGGTGAGCCCATTCATT  
 AGTTGCTGCTCGGAGGTCTTGGGTAGGAATGATCGGTGCCACTCGGCTAAGGTAA  
 ACACACATCTCAAGCTCACGAGCTCACGGGAGTACGACGCGCGCGGCAAGTGGT  
 TGTGTGATAGTTTTCAGTGGCTCGAGTGCCTCACTGCTCGGCGCGCGCTTCAAGCA  
 GACGCGCTGTAATCCGAGCAGAGGAGCATGCTGCAACCGAAATCCCGCTCTCGCGGG  
 CTGCGGCACTTAGGCTCGGTCTCCCTGTACGAGGTGGCTTTAGGGCGAGAGCGGCC  
 mbdR PstI 3' mbdR XhoI 3'  
 CAAACGCTTCACTTCAAGATGCGGATTTTTCAGGAGCTTCTATCCCAATCAAGCC  
 GTTTCGGAGGTGTA \* F T P N K C S G R D V I L G  
 3'mbdR mut2 (EcoRI)  
 ATTGAGAGTACCACTCAATGCTTTGGTAAAGGCTTCTCCGCTTAGTCTGCTCGGCT  
 N L L V S R L A K T L T K G T L E N P R  
 CCGATACCAITCAATGAGTACTCGGTATGGGCGCCATCAGGATGATGCCAGTTTCATC  
 R Y W E I L V G D H A A M V I S A L E D  
 ACTACCGGAATCGGACGAAATACACCTTCGGTTTGGCTTGTGCGATCAACTGTTCGAC  
 S G S D S R F V G E T Q G Q A I L Q E V  
 GTGCCATACATCCGACGTAATGGGCTTAGCCCTTTTCTCAATATCATCTCCGTTACC  
 H G Y M R R Y I A K A R K E I D D G T G  
 mbdR-A3 (EcoRI)  
 GGAAAAATCGATGGACACAAGAATAAGCAATAGGACATGCTGCGGCTTAGTACCTCCTAG  
 S F D I S V L I L L V H Q P K T V G L  
 GAGTGTGCTGATGTTGATGAATTCACCACTTCGCTGCGGAGCGGACCGGCTTCGC  
 L A Q M N I F K V L K A D A L P G A N A  
 CATGTACTATCGATCGGATCAACATGATCTTTCTGCTCTCAAGGAGCATCAGCAT  
 M Y E D I P D V I Y K E A E E L L M L M

GATTGCGTCTTTGGTCTTGAAATAGAAATAGATCGCACCCCTGGTCAATCCTGCTCTTGC 29460  
 I A D K T K F Y F Y I A G K T L G A R A 29460  
 CGCGATCATGTCGATCGTTGTGCGACGGTAACCATTTTTGACGAAAAGATCGAGCGCACA 29520  
 A I M D I T T A R Y G N K V F L D L A C 29520  
 5' mbdR mut2 (HindIII)  
 GCCCAGTATATTCTCGGTACTGGCCTTCCTCTGCTCTTCTCTCTGTCAGCTTCTCAT 29580  
 G L I N E T S A K R Q E E K K N L K R 29580  
 PmbdR XbaI 3' PmbdR EcoRI 3' mbdR NdeI 5' mbdR SalI 5' mbdR  
 CATGTCCTGAGAGATCAATGGATTGGCTCTCGGCACCTTCAGAGAAGTTGGCAATT 29640  
 CTACAGACCTCTACAAGGTTACCTAAACGGAGAGCCGTGAAGTCTCTTCCAACCGTTAAA 29640  
 mbdR-AS (BamHI)  
 TAAGTGAGAACCGCGCATTCTGAACGTTGCGCAGCCAGTCGACCTCGGGTTGTCCAGAAA 29700  
 ATTCACCTCTTGCGCGCTAAGACTTGCAAGCGGTGCGTCAGCTGGAGCCCAACAGGTCTTT 29700  
 GCGGTACGCGGCCACCGTCTCGCGGATTGGCCAAACCATTCATCAGCACCTTCGCC 29760  
 CGCCATGCGCCGGTGGCAGAGGCGCCTAACCGGTTGTGTAAGGTAGTCGTGGAAGCGG 29760  
 CGCTTGCCAGTTTCTGTCACCCAGCGCCATCCCCGAAAAATTCCTCCGCCACCCAGGCC 29820  
 GCGAACAGGTCAAAGAGCAGTGGGTGCGGTAAGGGCTTTTAAGGAGGCGGTGGTCCGG 29820  
 TTCGTGCGCAATCGGTACCCAAACTGTAAAGTAGACGCATTTACGCTGAGTTTACAA 29880  
 AAGCAGCGGTTAGCCAGTGGGTTTGACATTCTCATCTGCGTAAATGCGACTCAAATGTT 29880  
 TCGCTTGGTGTAAAGTGAATGAAGGTCAATGGATATTTGGTGGGCGCGTTGGTGGTGAAG 29940  
 AGCGAACACATTCACCTAACCTCCAGTTACCTATAAGCCAGCGCGTAACCCACTTC 29940  
 AGTTGTGTATAATAATATAAATTACAAGAGTATTTCGTGATGTACGGAATTGATGGATAC 30000  
 TCAACACATATTATATATTTAATGTCTCATAAAGCACTACATGCCTTAACCTATG 30000  
 PmbdR ScaI 5'  
 CTGACTTCGAGCAT 30014  
 GACTGAAGCTCGTA 30014  
 PmbdR KpnI 5'



## **V. DISCUSIÓN**



## 1. Identificación y caracterización genética del *cluster mbd*, responsable de la ruta central para el catabolismo anaeróbico de 3-metilbenzoato y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB

Como se ha indicado en el apartado 3.2 de la *Introducción* la ruta periférica encargada de la biotransformación anaeróbica del *m*-xileno conduce a la formación del metabolito intermediario 3-metilbenzoil-CoA. Por otro lado, el 3MBz podría activarse con un grupo CoA para formar también 3-metilbenzoil-CoA siguiendo un proceso de activación paralelo al seguido por el benzoato (Krieger *et al.*, 1999; para revisión ver Carmona *et al.*, 2009).

El objetivo principal de esta Tesis ha sido la identificación por primera vez de los determinantes génicos responsables de la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA. *Azoarcus* sp. CIB constituye uno de los pocos ejemplos descritos de microorganismos capaces de crecer anaeróbicamente empleando 3MBz como única fuente de carbono (Fig. 11), una habilidad que sólo se había documentado en algunas bacterias desnitrificantes tales como *Azoarcus* sp. T (Verfürth *et al.*, 2004) y *Azoarcus* sp. M3 (Leutwein y Heider, 2002) y en la cepa reductora de sulfato mXyS1 (Harms *et al.*, 1999).

El análisis *in silico* del genoma de *Azoarcus* sp. CIB reveló la existencia de una agrupación de 26 genes localizada junto al *cluster bss-bbs* responsable de la ruta periférica para la degradación anaeróbica del tolueno y *m*-xileno (Fig. 10) (Blázquez, 2009). El análisis de la secuencia de algunos de los genes incluidos en el nuevo *cluster* (Tabla 6) sugería su implicación en una nueva ruta anaeróbica central similar a la ruta central del benzoil-CoA (ruta bzd) en *Azoarcus* sp. CIB (López-Barragán *et al.*, 2004), y que se denominó ruta mbd (de *methyl-benzoate degradation*). La ruta mbd tendría como intermediario central al 3-metilbenzoil-CoA, que puede formarse a partir de la degradación del *m*-xileno por la ruta periférica *bss-bbs* o mediante la tioesterificación directa del 3MBz con un grupo CoA en una ruta periférica constituida por la 3MBz-CoA ligasa. A continuación se postula la pérdida de la aromaticidad del anillo bencénico del 3-metilbenzoil-CoA por la acción de la 3-metilbenzoil-CoA reductasa. El compuesto alicíclico resultante experimentaría un proceso similar al de una  $\beta$ -oxidación para formar un ácido graso alifático dicarboxílico. Otros genes incluidos en el *cluster mbd*, y cuyos productos se identifican con actividades hidratasa, deshidrogenasa y tiolasa, podrían



estar implicados en la incorporación del compuesto alifático dicarboxil-CoA al metabolismo central bacteriano.

La demostración experimental de que los genes del *cluster mbd* están implicados en el catabolismo anaeróbico del *m*-xileno y el 3MBz se obtuvo construyendo y analizando las estirpes mutantes *Azoarcus* sp. CIBdmbdO, *Azoarcus* sp. CIBdmbdY, *Azoarcus* sp. CIBdmbdA, *Azoarcus* sp. CIBdorf5 y *Azoarcus* sp. CIBdorf6, las cuales se mostraron incapaces de crecer anaeróbicamente empleando 3MBz o *m*-xileno (a excepción del mutante *mbdA*) como únicas fuentes de carbono (Fig. 12B). La observación de que los genes *mbd* se inducen específicamente en presencia de 3MBz (Figs. 18 y 21) y que ciertas actividades enzimáticas Mbd (tales como la 3-metilbenzoil-CoA reductasa) son también inducibles por 3MBz (apartado 3.2 de *Resultados*), corroboran la implicación del *cluster mbd* en el catabolismo anaeróbico del 3MBz. Dado que todos los mutantes *mbd* eran capaces de utilizar benzoato anaeróbicamente (Fig. 12B), se confirma la existencia de una ruta central distinta de la ruta *bzd* para la degradación de *m*-xileno y 3MBz en *Azoarcus* sp. CIB.

Como se ha indicado en la *Introducción*, una gran variedad de compuestos aromáticos son canalizados metabólicamente a través de las denominadas rutas periféricas hacia unas pocas rutas centrales anaeróbicas que tienen como sustrato a los compuestos benzoil-CoA, 2-aminobenzoil-CoA, 3-hidroxibenzoil-CoA, 6-hidroxinicotinato, resorcinol, floroglucinol e hidroxihidroquinona (para revisión ver Carmona *et al.*, 2009). Este trabajo es el primero que identifica y demuestra la existencia de una nueva ruta central, *mbd*, de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos (como *m*-xileno, 3MBz, *o*-cresol) a través del intermediario 3-metilbenzoil-CoA.

## 2. Caracterización bioquímica del *cluster mbd*

---

Una vez identificado el *cluster mbd*, se profundizó en el análisis bioquímico de la actividad enzimática inicial necesaria para la activación del 3MBz, así como en los dos primeros pasos del catabolismo anaeróbico del 3-metilbenzoil-CoA.

## 2.1. Identificación y caracterización de las actividades 3MBz-CoA ligasa, 3-metilbenzoil-CoA reductasa y metilciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa

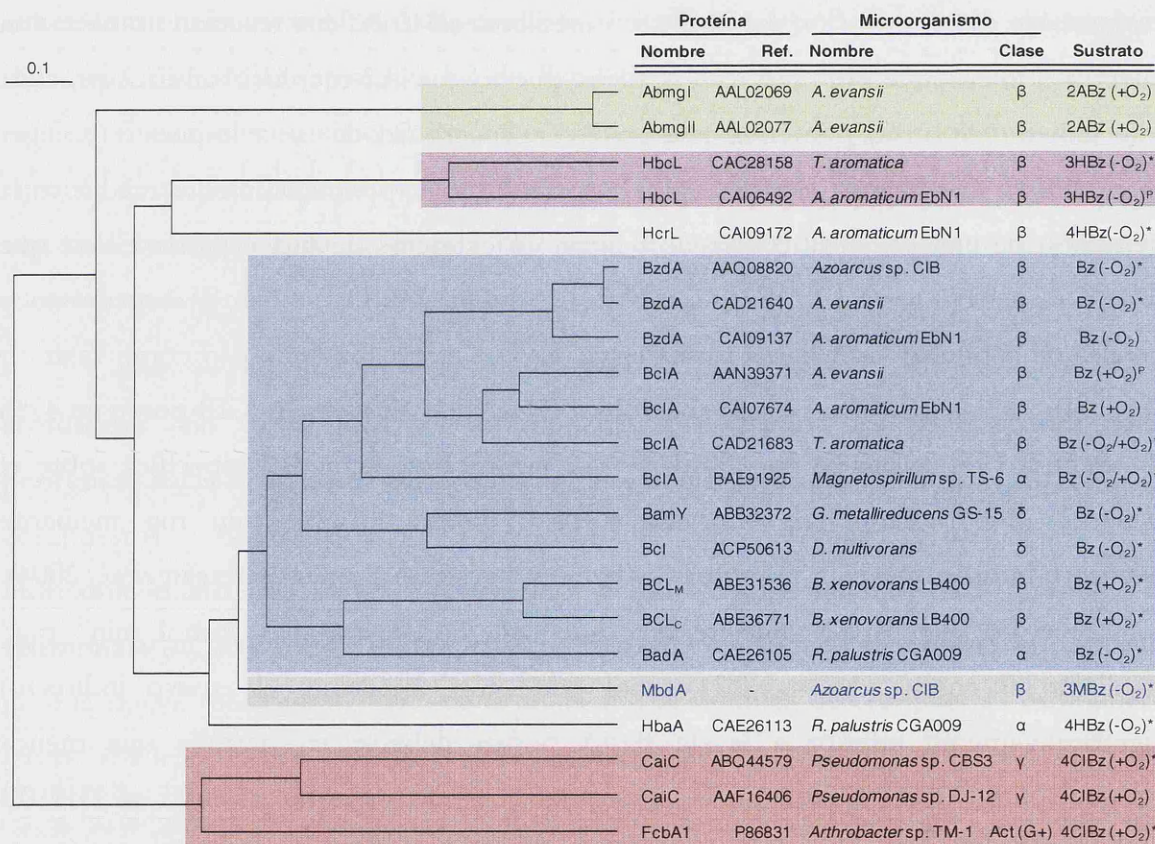
### 2.1.1. MbdA es la primera 3-metilbenzoato-CoA ligasa caracterizada

El análisis de la secuencia del producto del gen *mbdA* reveló su similitud con las enzimas benzoato-CoA ligasas (Tabla 6). Además, aunque la cepa mutante *Azotarcus* sp. CIBd*mbdA* fue incapaz de utilizar 3MBz, sin embargo, se mostró capaz de crecer en *m*-xileno. Este resultado está de acuerdo con el papel propuesto para el gen *mbdA* como responsable de la activación del 3MBz a 3-metilbenzoil-CoA, una reacción no necesaria cuando el microorganismo crece en *m*-xileno puesto que el 3-metilbenzoil-CoA procede directamente de la ruta periférica de degradación anaeróbica de este compuesto (Krieger *et al.*, 1999). La función del gen *mbdA* se confirmó experimentalmente mediante la detección de una actividad 3MBz-CoA ligasa en extractos de una cepa de *E. coli* que hiperexpresaba el gen *mbdA*. Curiosamente, la proteína MbdA también presentaba unos niveles de actividad CoA ligasa similares cuando se empleaba benzoato como sustrato (Fig. 14). La benzoato-CoA ligasa anaeróbica (BzdA) de *Azotarcus* sp. CIB posee un 47% de identidad de secuencia con MbdA y una significativa actividad específica sobre el benzoato ( $8.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  mediante el ensayo directo;  $1.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  mediante el ensayo indirecto) si bien no utiliza 3MBz como sustrato (López-Barragán *et al.*, 2004). El hecho de que MbdA muestre una actividad CoA-ligasa ( $0.31 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  mediante el ensayo directo,  $0.11 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  mediante el ensayo indirecto) significativamente inferior a la de BzdA podría deberse en parte a una menor producción de MbdA, que no pudo ser detectada cuando los extractos de *E. coli* DH10B (pUCmbdA) se analizaron mediante SDS-PAGE (datos no mostrados), al contrario de lo que se había observado con BzdA (López-Barragán *et al.*, 2004).

A diferencia de las benzoato-CoA ligasas, las cuales son capaces de actuar sobre un amplio rango de sustratos que incluye a distintos análogos del benzoato (como por ejemplo cloro y fluorobenzoatos, derivados hidroxilados, etc.) pero no al 3MBz, MbdA tiene un rango de sustratos que se limita al benzoato y a derivados metilados y halogenados de éste (principalmente con los sustituyentes en posición *meta*). Por ello, la proteína MbdA es, hasta la fecha, la primera 3MBz-CoA ligasa descrita, por lo que su utilización para la síntesis de derivados CoA del 3MBz podría resultar de interés

biotecnológico en la producción industrial de nuevos poliquétidos y otros compuestos de interés farmacéutico (Borejsza-Wysocki y Hrazdina, 1996; García-Bernardo *et al.*, 2004).

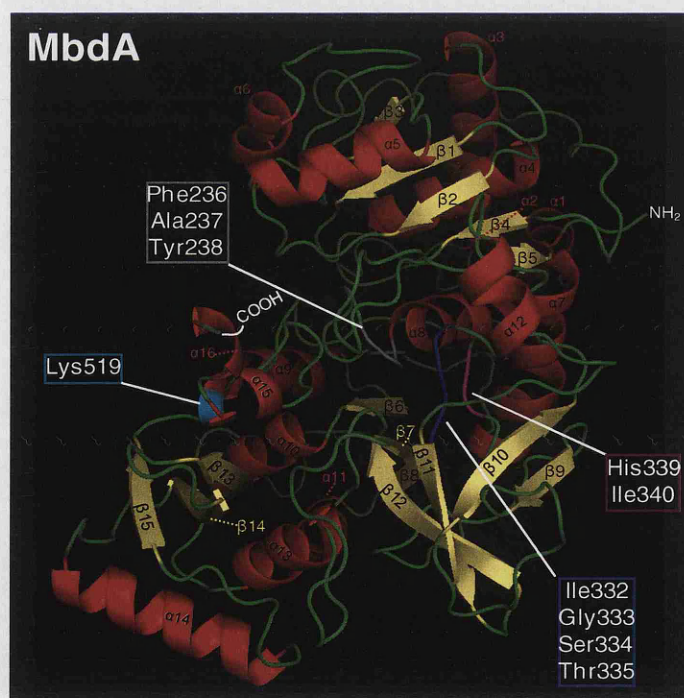
El análisis filogenético de las principales CoA ligasas de benzoato y sus derivados revela que éstas se agrupan en subfamilias según el sustrato de la ruta en la que intervienen: 3-hidroxibenzoato-CoA ligasas, benzoato-CoA ligasas, 4-hidroxibenzoato-CoA ligasas y 2-aminobenzoato-CoA ligasas (Fig. 43). La 3MBz-CoA ligasa (MbdA) está relacionada filogenéticamente con el grupo de las benzoato-CoA ligasas, si bien representa una rama evolutiva claramente diferente.



**Figura 43. Árbol filogenético de las principales CoA ligasas del benzoato y sus derivados.** El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa ClustalW y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*. La barra que indica la escala equivale a una sustitución de un aminoácido por cada 10. Cada proteína se identifica por su nombre y por su código de GenBank. Además se detalla el nombre de la bacteria en la que se ha identificado y, dado que la mayoría son microorganismos Gram-negativos del filo Proteobacterias, se indica a qué clase pertenecen. Las cepas Gram-positivas se indican específicamente (G+). Por otro lado, se indica el compuesto aromático que actúa como sustrato de la ruta catabólica, si ésta actúa en presencia de oxígeno (+O<sub>2</sub>) o en condiciones anóxicas (-O<sub>2</sub>), y si la proteína se caracterizó bioquímicamente (\*) o se identificó mediante estudios proteómicos (P). Las abreviaturas de los compuestos aromáticos que aparecen en la figura son: Bz (benzoato), 3HBz (3-hidroxibenzoato), 4HBz (4-hidroxibenzoato), 4ClBz (4-clorobenzoato), 3MBz (3-metilbenzoato), 2ABz (2-aminobenzoato). Los rectángulos sombreados en diferentes colores señalan diferentes grupos de CoA ligasas: violeta, 3HBz-CoA ligasas; azul, Bz-CoA ligasas; verde, 2ABz-CoA ligasas; rojo, 4ClBz-CoA ligasas; gris, 3MBz-CoA ligasa.



Hasta la fecha la única benzoato-CoA ligasa cuya estructura tridimensional ha sido dilucidada (PDB 2V7B) es la proteína BCL<sub>M</sub> perteneciente a la ruta aeróbica de degradación de benzoato (ruta box) de la  $\beta$ -proteobacteria *Burkholderia xenovorans* LB400 (Goris *et al.*, 2004; Bains y Boulanger, 2007). Como se ha indicado en la *Introducción*, algunos microorganismos anaerobios facultativos son capaces de degradar aeróbicamente el benzoato mediante su activación con un grupo CoA a través de la ruta aeróbica híbrida box (Ferrández *et al.*, 1998; Gescher *et al.*, 2002; Schühle *et al.*, 2003; Gescher *et al.*, 2006). Las benzoato-CoA ligasas de las rutas aeróbicas híbridas de degradación del benzoato son similares a las implicadas en rutas anaeróbicas (Fig. 43) (Fuchs, 2008). La proteína BCL<sub>M</sub> posee un 43% de identidad de secuencia con MbdA, que se refleja por ejemplo en la conservación de los aminoácidos clave para la interacción con el sustrato (Bains y Boulanger, 2007): Phe236, Ala237, Tyr238, Ile332, Gly333, Ser334, Thr335, His339, Ile340 y Lys519 (en posición 520 en BCL<sub>M</sub>). En la Figura 44 se muestra un modelo de la estructura tridimensional predicha para MbdA y la localización de los aminoácidos catalíticos reseñados anteriormente.



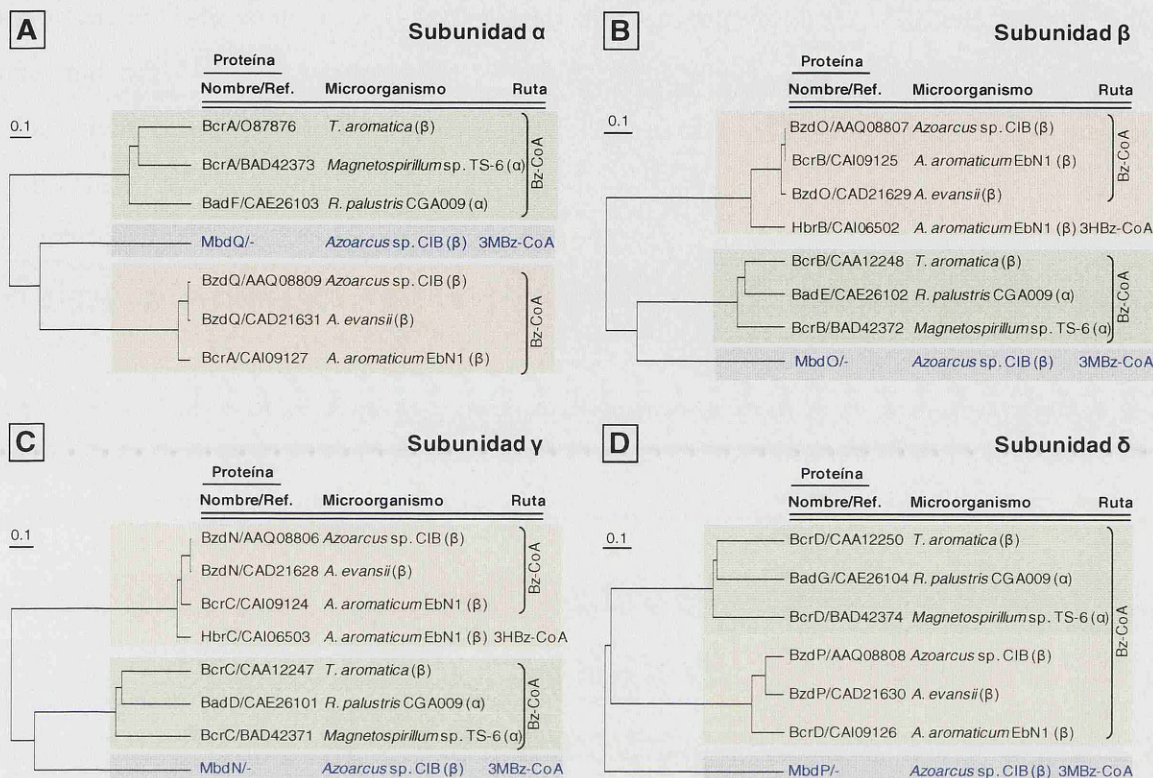
**Figura 44. Modelo de la estructura tridimensional propuesta para MbdA.** Para la obtención del modelo se ha empleado la aplicación 3D-Jigsaw (ver la sección 9.3 de *Materiales y Métodos*) utilizando como molde la proteína BCL<sub>M</sub> de *B. xenovorans* LB400 (PDB 2V7B). Los residuos presuntamente implicados en la interacción con el 3MBz aparecen recuadrados con diferentes colores y señalados en el modelo.

Las bacterias anaerobias facultativas de los géneros *Azoarcus*, *Thauera*, *Rhodopseudomonas* y *Magnetospirillum* poseen en su genoma un número variable de genes codificantes de actividades benzoato-CoA ligasas. Sin embargo, el rango de sustratos de estas CoA ligasas y los factores que determinan su expresión, varían sensiblemente entre los diferentes géneros. En *R. palustris* CGA009 existen tres CoA ligasas que activan el benzoato, pero así como BadA (CAE26105) es altamente específica para este compuesto aromático (Geissler *et al.*, 1988; Eglund *et al.*, 1995), HbaA (CAE26113) también actúa sobre el 4-hidroxibenzoato (Gibson *et al.*, 1994; Eglund *et al.*, 1995) y AliA (AAC23919) sobre el ciclohexanocarboxilato (compuesto alicíclico; Eglund *et al.*, 1995; Eglund *et al.*, 1997). Por el contrario, en *T. aromatica* en lugar de existir varias proteínas con actividad benzoato-CoA ligasa existe una sola proteína, BclA (CAD21683), capaz de transformar el benzoato en benzoil-CoA en presencia o en ausencia de oxígeno, y además es capaz de actuar sobre el 2-aminobenzoato (Schühle *et al.*, 2003). En *Magnetospirillum* sp. TS-6 también existe sólo una proteína BclA (BAE91925) que interviene en la degradación del benzoato tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Kawaguchi *et al.*, 2006). La presencia en cepas del género *Azoarcus* de varias isoenzimas capaces de activar benzoato a benzoil-CoA, como por ejemplo la benzoato-CoA ligasa anaeróbica BzdA (AAQ08820; López-Barragán *et al.*, 2004), la benzoato-CoA ligasa aeróbica BclA (AAN39371; Gescher *et al.*, 2002) y la 3MBz-CoA ligasa MbdA sugiere una estrategia similar a la descrita en *R. palustris* CGA009 en donde cada *cluster* catabólico codifica la correspondiente actividad CoA ligasa que inicia la ruta catabólica. La presencia de múltiples isoenzimas que tengan un nivel de expresión basal podría suponer una ventaja adaptativa para facilitar una buena actividad CoA ligasa en la célula y como salvaguarda en el caso de que alguna de ellas se inactive mediante mutación.

### **2.1.2. Identificación de la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa, la etapa clave de la nueva ruta central mbd**

El paso esencial para la degradación anaeróbica de los compuestos aromáticos activados con CoA es la pérdida de la aromaticidad del anillo bencénico mediante una actividad reductasa. Los genes *mbdONQP* muestran similitud con los genes que codifican las cuatro subunidades de las benzoil-CoA reductasas dependientes de ATP de otros microorganismos anaerobios facultativos (Tabla 6). El hecho de que la cepa mutante *Azoarcus* sp. CIBdmbdO no posea actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa





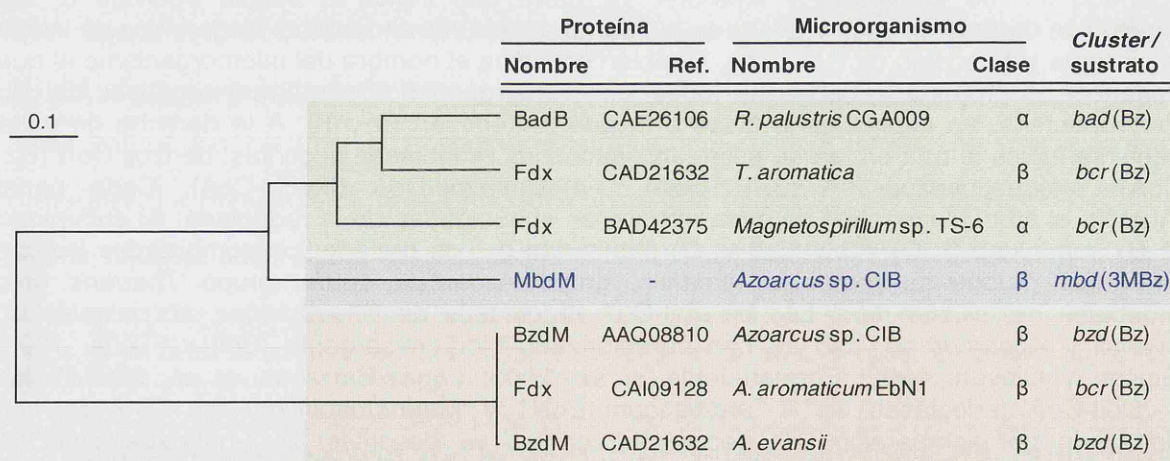
**Figura 45. Árbol filogenético de cada una de las subunidades que conforman las reductasas de compuestos aromáticos activados con CoA en microorganismos anaerobios facultativos.** El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa ClustalW y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*. La barra que indica la escala equivale a una sustitución de un aminoácido por cada 10. Junto a cada rama del árbol filogenético se indica la proteína y su código de GenBank. También se indica el nombre del microorganismo al que pertenece la proteína y, dado que todos los microorganismos son Gram-negativos del filo Proteobacteria, se especifica la clase a la que pertenecen (α o β). A la derecha de cada panel se indica la ruta en la que están implicadas las reductasas descritas: benzoil-CoA (Bz-CoA), 3-hidroxibenzoil-CoA (3HBz-CoA), 3-metilbenzoil-CoA (3MBz-CoA). Cada panel muestra el árbol filogenético de cada una de las subunidades de la reductasa: **A)** subunidad α; **B)** subunidad β; **C)** subunidad γ; **D)** subunidad δ. Los rectángulos sombreados indican diferentes grupos de proteínas: amarillo, grupo *Azoarcus*; verde, grupo *Thauera*; gris, reductasa del cluster *mbd*. Las benzoil-CoA reductasas de *T. aromatica*, *R. palustris*, *A. evansii* y *Azoarcus* sp. CIB se han caracterizado bioquímicamente (Boll y Fuchs, 1995; Gibson y Gibson, 1992; Ebenau-Jehle *et al.*, 2003; López-Barragán *et al.*, 2004a); las benzoil-CoA reductasas de *A. aromaticum* EbN1 y *Magnetospirillum* sp. TS-6 se han detectado por comparación de secuencia con las ya descritas; la 3-hidroxibenzoil-CoA (3HBz-CoA) reductasa de *A. aromaticum* EbN1 pertenece a un cluster que muestra una inducción específica en presencia de 3-hidroxibenzoato (Wöhlbrand *et al.*, 2007). Las subunidades α y δ de la 3-hidroxibenzoil-CoA reductasa son idénticas a las correspondientes subunidades de la benzoil-CoA reductasa de *A. aromaticum* EbN1.

sugiere que el gen *mbdO*, al menos, y muy probablemente los genes *mbdNPQ*, codifican el complejo enzimático encargado de la reducción del 3-metilbenzoil-CoA. Merece la pena destacar que la 3-metilbenzoil-CoA reductasa también reconoce eficazmente el benzoil-CoA como sustrato y viceversa, la benzoil-CoA reductasa también reconoce el 3-metilbenzoil-CoA como sustrato (Fig. 15). Este resultado está



de acuerdo con observaciones previas que demuestran que la benzoil-CoA reductasa purificada de *T. aromatica* es capaz de reducir no sólo el benzoil-CoA sino también, aunque con menor eficiencia, a algunos de sus derivados metilados e hidroxilados tales como el 3-metilbenzoil-CoA y el 3-hidroxibenzoil-CoA (Laempe *et al.*, 2001; Möbitz y Boll, 2002). La existencia de una 3-metilbenzoil-CoA reductasa y una 3-hidroxibenzoil-CoA reductasa (Rabus *et al.*, 2005) diferentes a la benzoil-CoA reductasa en cepas del género *Azoarcus* podría deberse a una mayor actividad específica de estas reductasas por sus correspondientes sustratos y al hecho de una inducción diferencial de estas enzimas cuando las células se cultivan en los diferentes derivados del benzoato, tal y como se ha determinado en esta Tesis con la inducción de la 3-metilbenzoil-CoA reductasa en presencia de 3MBz.

El análisis filogenético de las cuatro subunidades de las CoA reductasas dependientes de ATP implicadas en rutas catabólicas de compuestos aromáticos revela la existencia de tres grupos evolutivos: a) benzoil-CoA reductasas de los géneros *Thauera*/*Rhodospseudomonas*/*Magnetospirillum*; b) benzoil-CoA reductasas y 3-hidroxibenzoil-CoA reductasa de los géneros *Azoarcus*/*Aromatoleum*; c) 3-metilbenzoil-CoA reductasa (Fig. 45).



**Figura 46. Árbol filogenético de las ferredoxinas asociadas a benzoil-CoA reductasas dependientes de ATP.** El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa ClustalW y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*. La barra que indica la escala equivale a una sustitución de un aminoácido por cada 10. Junto a cada rama del árbol filogenético se indica la proteína y su código de GenBank. También se indica el nombre del microorganismo al que pertenece la proteína y, dado que todos los microorganismos son Gram-negativos del filo Proteobacteria, se indica la clase a la que pertenecen (α o β). A la derecha se detalla el *cluster* en el que se localizan los genes y entre paréntesis el compuesto aromático sustrato de la ruta catabólica. Los rectángulos sombreados indican diferentes grupos de proteínas: amarillo, grupo *Azoarcus*; verde, grupo *Thauera*; gris, ferredoxina del *cluster mbd*.



Los *clusters* génicos responsables de las rutas anaeróbicas de degradación de compuestos aromáticos contienen frecuentemente genes codificantes de las ferredoxinas encargadas de suministrar el poder reductor al complejo reductasa (Fig. 5). En la Figura 46 se muestra el árbol filogenético resultante de la comparación de diversas ferredoxinas presentes en los *clusters* catabólicos de *Azoarcus* sp. CIB, *T. aromatica*, *R. palustris*, *A. evansii*, *A. aromaticum* EbN1 y *Magnetospirillum* ST-6. Podemos observar que al igual que sucede con las reductasas, las ferredoxinas asociadas a benzoil-CoA reductasas de los géneros *Azoarcus*/*Aromatoleum* forman un grupo evolutivo diferente (grupo *Azoarcus*) al constituido por las ferredoxinas asociadas a benzoil-CoA reductasas de los géneros *Thauera*/*Rhodospseudomonas*/*Magnetospirillum* (grupo *Thauera*). Curiosamente, la ferredoxina MbdM asociada a la 3-metilbenzoil-CoA reductasa está más próxima filogenéticamente al grupo *Thauera*. Esta similitud se podría corresponder con la existencia en el *cluster mbd* de sistemas de regeneración de poder reductor, que ceden los electrones a la ferredoxina, similares a los descritos en *Thauera* (Dörner y Boll, 2002).

Los sistemas de regeneración de poder reductor transfieren electrones a las ferredoxinas, que a su vez se los transfieren a las reductasas de compuestos aromáticos. Las actividades enzimáticas descritas hasta el momento que cumplen la función regeneradora del poder reductor son la  $\alpha$ -cetoglutarato:ferredoxina óxido-reductasa de *T. aromatica* (Dörner y Boll, 2002) y la  $\alpha$ -cetoglutarato:NADP<sup>+</sup> óxido-reductasa de *A. evansii* (Ebenau-Jehle *et al.*, 2003). Ambas actividades catalizan la transformación de  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA, por lo que se conocen como KGOR (*k*eto-*g*lutarato *o*xido-*r*eductases), y se diferencian, entre otras cosas, en el número de subunidades que las componen. La actividad KGOR descrita en *T. aromatica* está codificada por los genes *korAB*, incluidos en el *cluster bcr* para la degradación anaeróbica del benzoato, al igual que en *Magnetospirillum* y algunas cepas de *Rhodospseudomonas*. La actividad KGOR de *A. evansii* está constituida por tres subunidades diferentes codificadas por los genes *korCAB*, no ligados al *cluster bzd*, y se acopla a una NADPH:ferredoxina óxido-reductasa posiblemente codificada por el gen *bzdV* (para revisión Carmona *et al.*, 2009). El análisis del genoma de *Azoarcus* sp. CIB revela la existencia de tres posibles sistemas KGOR, dos de ellos de tipo *Thauera* (*korA1B1* y *korA2B2*) y uno de tipo *Azoarcus* (*korCAB*). Los genes *korA2B2* se localizan en el *cluster mbd* inmediatamente adyacentes al gen *mbdM*, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la 3-metilbenzoil-CoA reductasa utiliza un sistema regenerador de poder reductor similar al caracterizado en *T. aromatica* y diferente al de la benzoil-CoA reductasa de la cepa CIB. Esta observación también está de

acuerdo con el hecho de que un mutante en la ruta *bzd*, *Azoarcus* sp. CIBdbzdN, es capaz de utilizar 3MBz como única fuente de carbono, lo que sugiere que la reducción del 3-metilbenzoil-CoA no depende del sistema regenerador KorABC que involucra también al gen *bzdV* del *cluster bzd*. No obstante, la confirmación de que la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa requiere la participación de la ferredoxina MbdM y la enzima KGOR (KorA2B2) necesita un estudio bioquímico adicional.

### 2.1.3. Purificación y caracterización de la metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa (MbdW)

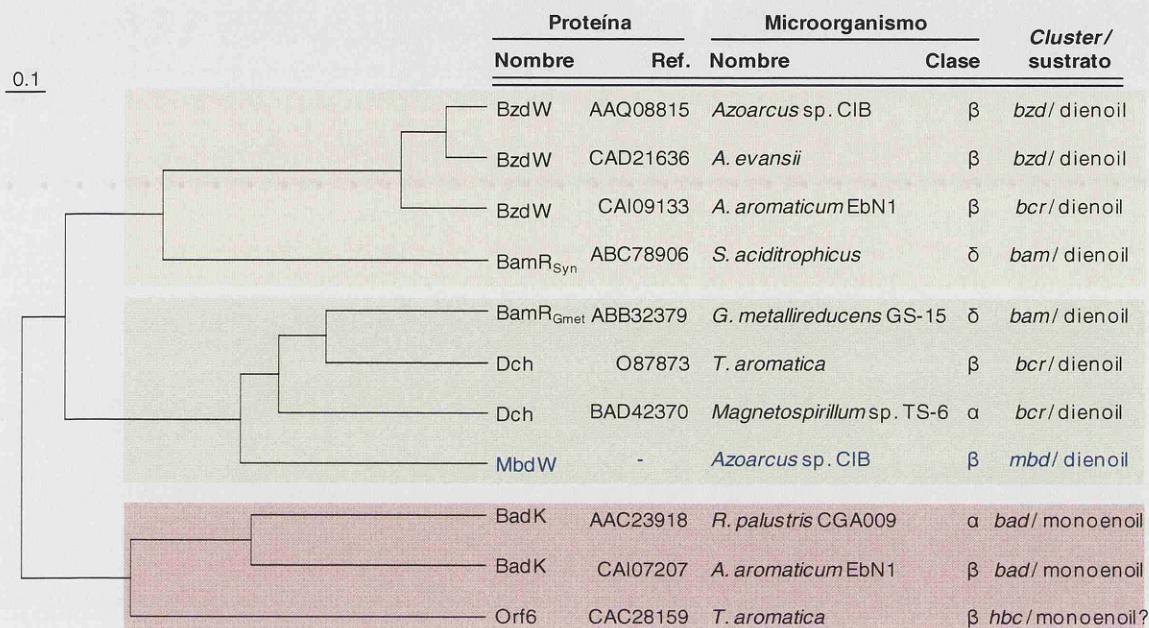
El análisis del *cluster mbd* revela la presencia de tres genes cuyos productos muestran similitud de secuencia con las enzimas necesarias para la  $\beta$ -oxidación modificada del compuesto alicíclico producto de la reducción del benzoil-CoA (Fig. 3). Estos tres genes se denominaron *mbdW*, *mbdX* y *mbdY*, atendiendo a la nomenclatura de los genes equivalente en el *cluster bzd* y presuntamente codifican las actividades metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa (MbdW), metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA deshidrogenasa (MbdX), y metil-6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidrolasa (MbdY), respectivamente (Tabla 6).

La actividad metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa es la encargada de iniciar la  $\beta$ -oxidación del compuesto alicíclico generado tras la reducción del 3-metilbenzoil-CoA. En el transcurso de esta Tesis Doctoral se clonó el gen *mbdW*, se purificó la proteína MbdW y se caracterizó su actividad enzimática. Los ensayos de actividad enzimática mostraron que MbdW es capaz de catalizar la reacción de hidratación (metil-dienoil-CoA  $\rightarrow$  metil-6OH-monoenoil-CoA) y la reacción reversa (metil-6OH-monoenoil-CoA  $\rightarrow$  metil-dienoil-CoA). Además MbdW reconoce como sustrato tanto los derivados metilados como los no metilados (ver Fig. 17). MbdW posee una actividad específica similar a la de hidratasa ortólogas tales como BamR<sub>Syn</sub> (apartado 3.3 de *Resultados*).

La caracterización de la proteína MbdW como una metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa ha permitido confirmar la ruta anaeróbica de degradación de 3MBz vía reducción del anillo aromático con dos electrones, similar a la descrita para la degradación anaeróbica del benzoato en bacterias anaerobias no fotosintéticas (Fig. 3).

La conformación nativa de la proteína MbdW recombinante purificada se definió como un dímero-trímero mediante experimentos de filtración en gel. Un estado

oligomérico similar también había sido determinado para la proteína BamR<sub>Geo</sub>, la cual ejerce la actividad ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa en la ruta de degradación anaeróbica del benzoato en *G. metallireducens* (Peters *et al.*, 2007), y está de acuerdo con el estado dimérico determinado para la hidratasa Dch de *T. aromatica* (Laempe *et al.*, 1998).



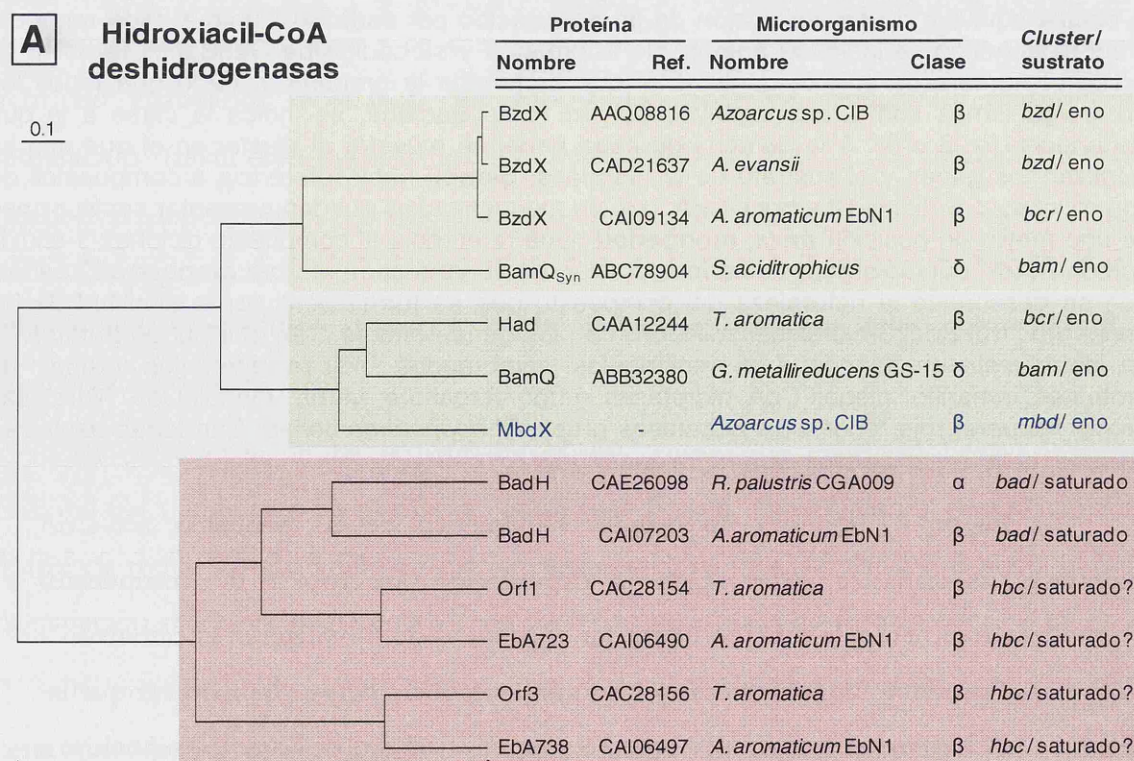
**Figura 47. Árbol filogenético de diferentes acil-CoA hidratasas presentes en clusters de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos.** El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa ClustalW y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*. La barra que indica la escala equivale a una sustitución de un aminoácido por cada 10. Junto a cada rama del árbol filogenético se indica el nombre de la proteína y su código de GenBank. También se indica el nombre del microorganismo al que pertenece la proteína y, dado que todos los microorganismos son Gram-negativos del filo Proteobacteria, se indica la clase a la que pertenecen ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ ). A la derecha de cada panel se muestra el *cluster* en el que se localizan los genes y el sustrato de la hidratasa: **dienoil** hace referencia a compuestos de tipo ciclohex-1,5-dieno-1-carbonil-CoA, que en algunos casos pueden presentar sustituciones de tipo metilo en posición *meta*; **monoenoil** hace referencia al compuesto ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA, que sólo posee una insaturación en su estructura cíclica; **monoenoil?** señala que se desconoce la naturaleza del compuesto que se forma pero por la similitud de los genes *hbc* (ruta del 3-hidroxibenzoil-CoA) con los genes *bad* se cree que puede tratarse de un compuesto monoenoil. Los rectángulos sombreados indican diferentes grupos de proteínas: amarillo, dienoil-CoA hidratasas grupo *Azoarcus*; verde, dienoil-CoA hidratasas grupo *Thauera*; rojo, enoil-CoA hidratasas grupo *Rhodopseudomonas*. Con letras azules se representa la 3-metilbenzoil-CoA hidratasa MbdW.

La Figura 47 muestra un estudio filogenético de las proteínas acil-CoA hidratasas asociadas a *clusters* para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos que tienen la función de iniciar el proceso de  $\beta$ -oxidación encaminado a degradar el producto de la reducción del anillo aromático. Se puede observar que las dienoil-CoA hidratasas forman dos grandes grupos: a) el grupo *Thauera* que incluye a

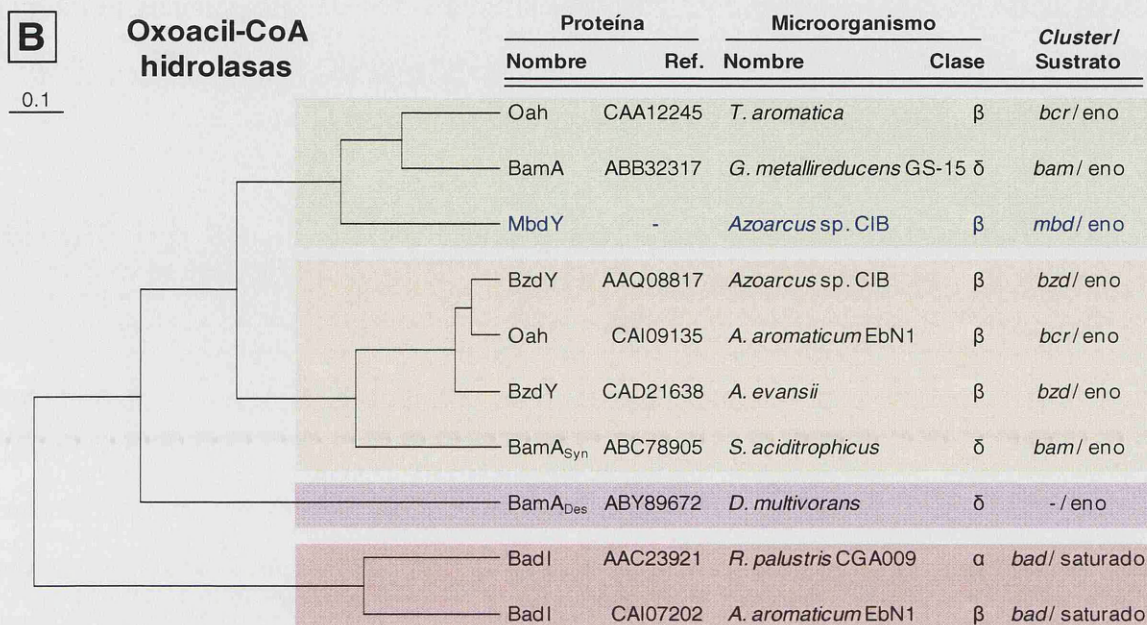


las hidratatasas de *T. aromatica* (Dch), *G. metallireducens* (BamR) y *Magnetospirillum* (Dch), así como a MbdW; b) el grupo *Azoarcus* que incluye a las hidratatasas de bacterias de los géneros *Azoarcus*, *Aromatoleum* y *Syntrophus*. Por el contrario, la ciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (monoenoil-CoA) hidratasa de *R. palustris* (BadK) se agrupa con las hidratatasas relacionadas con la ruta del 3-hidroxibenzoil-CoA (ruta *hbc*) en *Thauera* y *Azoarcus* (Fig. 47).

Por analogía con la ruta *bzd* (Fig. 3), el producto de la catálisis de MbdW sufrirá sucesivamente una deshidrogenación y una hidrólisis. MbdX codificaría una actividad metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA deshidrogenasa, mientras que MbdY sería responsable de la actividad metil-6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidrolasa que actuaría a continuación, provocando una ruptura hidrolítica del anillo alicíclico que daría lugar al compuesto alifático hidroximetil-pimelil-CoA. El análisis filogenético de MbdX, MbdY y las correspondientes proteínas con una funcionalidad similar presentes en los *clusters* anaeróbicos para la degradación del benzoato reveló, de nuevo, que tanto MbdX como MbdY muestran una similitud mayor con el grupo evolutivo *Thauera* que con el grupo *Azoarcus* (Fig. 48). Ambos grupos están alejados filogenéticamente de las deshidrogenasas e hidrolasas que actúan en la ruta del 3-hidroxibenzoato o en la ruta del benzoil-CoA de *R. palustris* (Fig. 48).







**Figura 48** (comienza en la página anterior). **Árboles filogenéticos de diferentes hidroxiaxil-CoA deshidrogenasas, (A) y oxoacil-CoA hidrolasas, (B), presentes en clusters de degradación anaeróbica de compuestos aromáticos.** El alineamiento múltiple de las proteínas se realizó con el programa ClustaW y el árbol filogenético se ha realizado y visualizado como se indica en el apartado 9.2 de *Materiales y Métodos*. La barra que indica la escala equivale a una sustitución de un aminoácido por cada 10. Junto a cada rama del árbol filogenético se indica el nombre de la proteína y su código de GenBank. También se indica el nombre del microorganismo al que pertenece la proteína y, dado que todos los microorganismos son Gram-negativos del filo Proteobacteria, se indica la clase a la que pertenecen (α, β o δ). A la derecha de cada panel se muestra el *cluster* en el que se localizan los genes y el tipo de hidroxiaxil-CoA/oxoacil-CoA sustrato de las deshidrogenasas/hidrolasas. La abreviatura **eno** hace referencia a la existencia de enlaces insaturados en el compuesto cíclico sustrato de la deshidrogenación/hidrólisis, mientras que **saturado** indica su carencia; **saturado?** indica que se desconoce la naturaleza del derivado formado, pero por la similitud de los genes *hbc* con los *bad* se considera más probable la formación del compuesto saturado. Los compuestos insaturados son el 6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (sustrato de las deshidrogenasas) y 6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA (sustrato de las hidrolasas) que en algunos casos pueden presentar sustituciones de tipo metilo. Saturado hace referencia a los compuestos 2-hidroxiciclohexano-1-carbonil-CoA (sustrato de las deshidrogenasas) y 2-cetociclohexano-1-carbonil-CoA (sustrato de las hidrolasas). Los rectángulos sombreados indican diferentes grupos de proteínas: amarillo, grupo *Azoarcus*; verde, grupo *Thauera*; rojo, grupo *R. palustris*; violeta, *Desulfococcus*. Con letras azules se representa la 3-metilbenzoil-CoA hidratasa MbdW.

Los diferentes análisis filogenéticos presentados en esta Tesis sugieren que tanto el sistema regenerador de poder reductor de la reductasa (MbdM y KorA2B2) como las enzimas implicadas en la β-oxidación del producto de reducción del anillo aromático (*mbdWXY*) en la ruta mbd tienen un origen evolutivo más próximo al de los correspondientes sistemas de la ruta del benzoil-CoA de *Thauera/Magnetospirillum* que al de los sistemas de la ruta del benzoil-CoA de las cepas del propio género *Azoarcus/Aromatoleum*. La adquisición de los genes *mbdMkorA2B2* y *mbdWXY* por la ruta mbd de *Azoarcus* sp. CIB a partir de los genes equivalentes de la ruta del

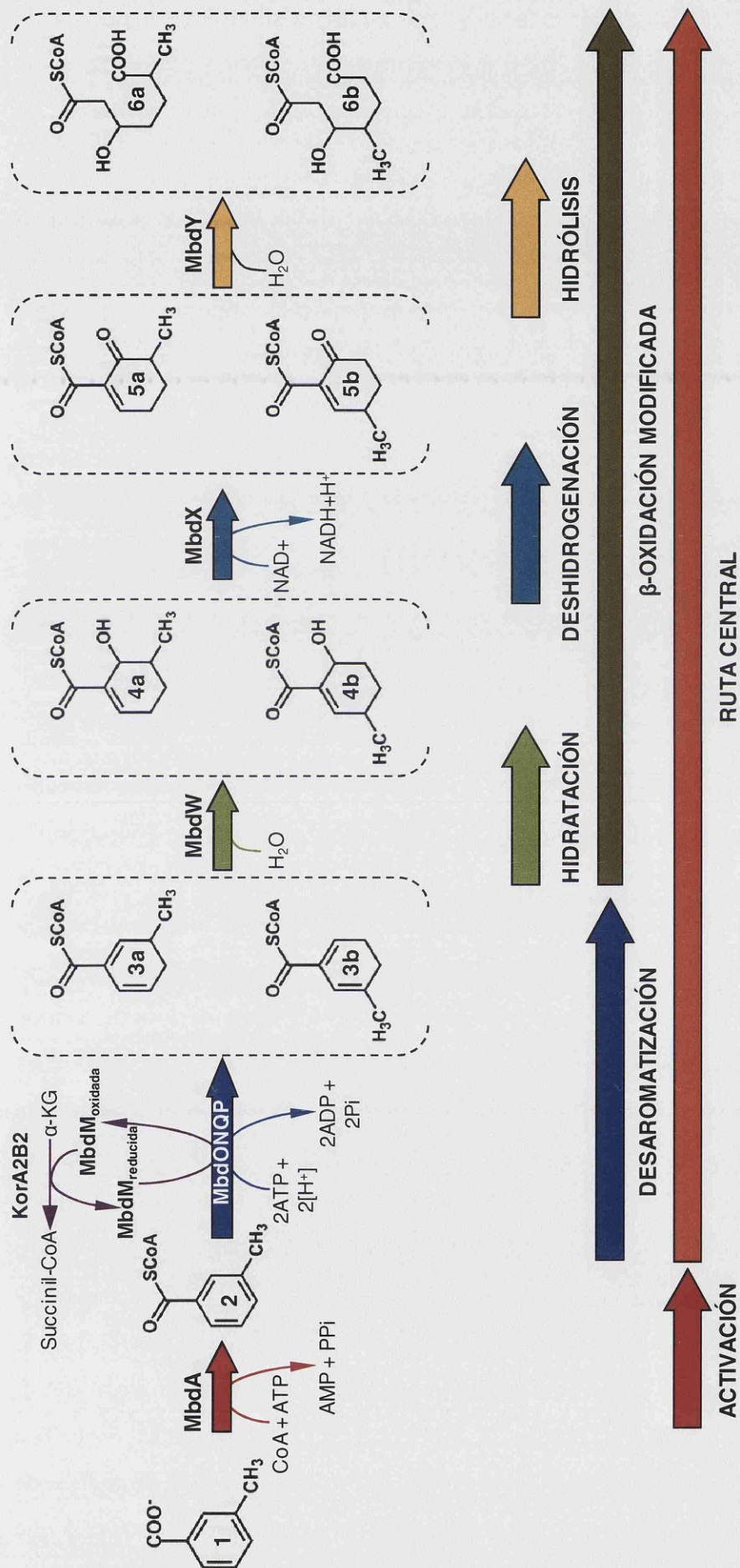
benzoil-CoA de *Thauera/Magnetospirillum* mediante procesos de transferencia horizontal de DNA y su posterior adaptación para un metabolismo eficaz del 3-metilbenzoil-CoA, supone una hipótesis plausible que debería ser estudiada en el futuro.

## 2.2. Análisis del resto de los genes catabólicos del *cluster mbd*: propuesta de la ruta mbd

Las evidencias experimentales obtenidas del análisis de la actividad de la 3MBz-CoA ligasa (MbdA), la 3-metilbenzoil-CoA reductasa (MbdONQP) y la dienol-CoA hidratasa (MbdW), así como la similitud de secuencia de las proteínas MbdWXY con las proteínas equivalentes de la ruta central del benzoil-CoA en *Thauera/Magnetospirillum*, nos permiten proponer un esquema de las transformaciones bioquímicas que experimenta el 3-metilbenzoil-CoA hasta el producto de la apertura del anillo (hidroximetil-pimelil-CoA) (Fig. 49). Sin embargo, se requieren datos experimentales para identificar cuál es exactamente el derivado dienol-CoA generado por la acción de la 3-metilbenzoil-CoA reductasa. La pérdida de la aromaticidad del 3-metilbenzoil-CoA debido a la actividad reductasa implica la existencia de dos posibles productos diferentes según la posición del grupo metilo respecto a los dos dobles enlaces generados: 3-metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (3a) y 5-metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA (3b) (Fig. 49). La acción sucesiva de MbdW, MbdX y MbdY sobre uno de los dos intermediarios formados, presumiblemente conduciría a la apertura del anillo con la formación de un 3-hidroximetil-pimelil-CoA que contendría un grupo metilo ubicado en las posiciones 6 (6a) ó 4 (6b) (Fig. 49).

El producto resultante de la apertura del anillo alicíclico derivado de la reducción del benzoato en *R. palustris*, el pimelil-CoA, sufre una  $\beta$ -oxidación que conduce a la formación de glutaril-CoA y en la que interviene el *cluster pim* que codifica una acil-CoA deshidrogenasa (PimCD), una enoil-CoA hidratasa (PimF), una hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (PimE) y una  $\beta$ -cetotilasa (PimB) (Harrison y Harwood, 2005). El *cluster thn*, responsable de la degradación de la tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) en *Sphingomonas macrogolita* TFA, codifica las proteínas ThnJKLMIN que guardan similitud con PimCDFEB de *R. palustris* y participan en la incorporación del pimelil-CoA generado en la degradación del compuesto bicíclico al metabolismo central de la bacteria (López-Sánchez *et al.*, 2010). En ambos microorganismos, la generación de mutantes en estos genes no supone la pérdida de la capacidad de crecimiento en los compuestos aromáticos en cuya ruta participan, lo que sugiere que otros *clusters* génicos que codifican



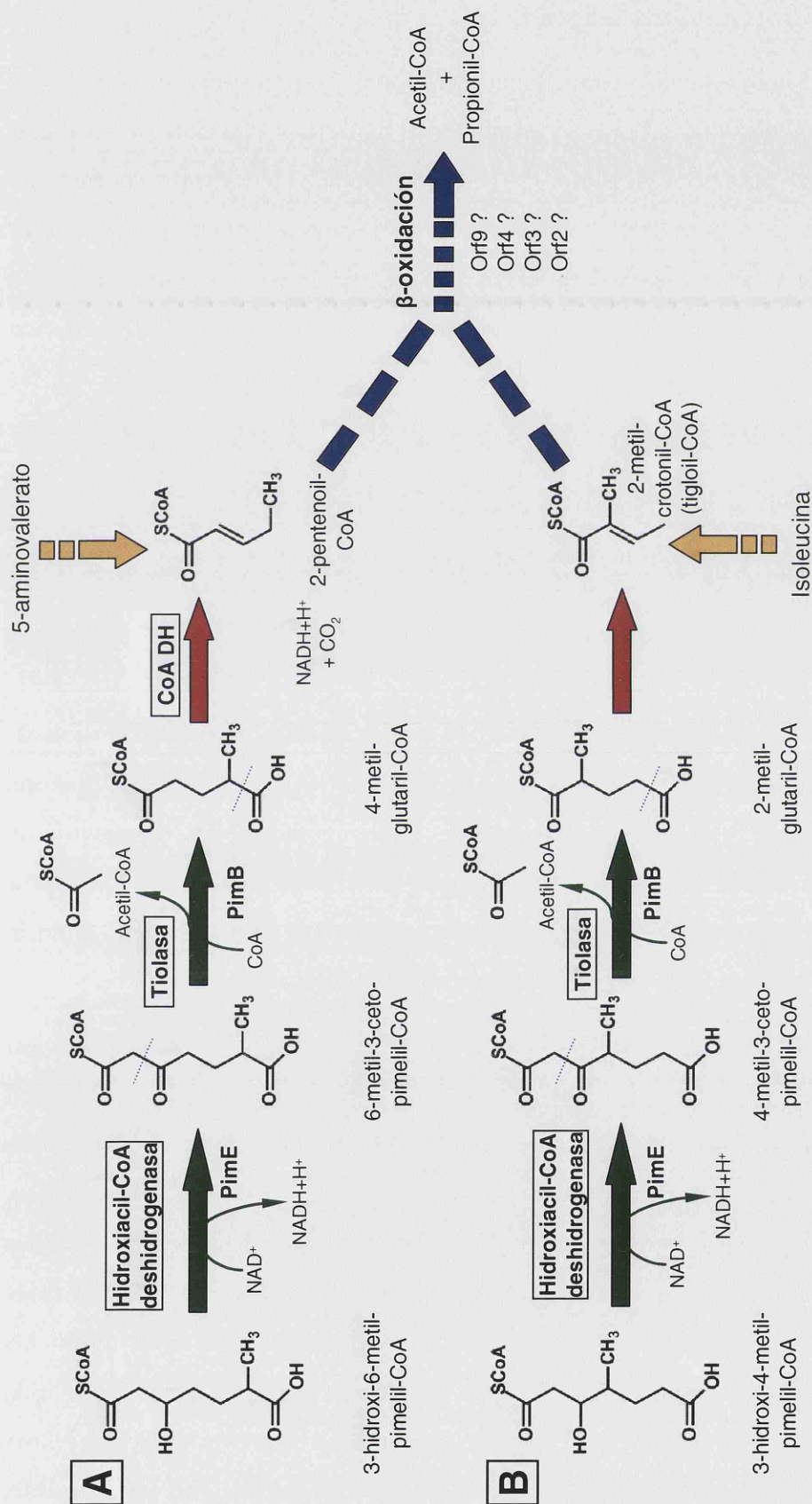


**Figura 49. Esquema bioquímico propuesto para la activación y la ruta central (ruta alta) implicada en el catabolismo anaeróbico de 3MBz en *Azoarcus* sp. CIB.** Las proteínas que catalizan las reacciones, así como otras moléculas necesarias para la catálisis, se indican en cada paso. Las flechas simbolizan las actividades 3MBz-CoA ligasa MbdA (roja), 3-metilbenzoyl-CoA reductasa MbdONQP (azul oscuro), metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa MbdW (verde claro), metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA deshidrogenasa MbdX (azul claro), metil-6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidrolasa MbdY (amarillo) y el sistema de regeneración de poder reductor KorA2B2/MbdM (morado). Los compuestos que aparecen en el esquema son los siguientes: [1] 3MBz; [2] 3-metilbenzoyl-CoA; [3] metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA; [4] metil-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; [5] metil-6-cetociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA; [6] 3-hidroxi-metil-pimellil-CoA. a) y b) indican los dos posibles isómeros que se pueden generar en la ruta.

rutas de  $\beta$ -oxidación de ácidos dicarboxílicos y que están presentes en el genoma de estas bacterias pueden suplir a los genes *pim* y *thn* involucrados en las rutas bajas de incorporación al metabolismo central (Harrison y Harwood, 2005; López-Sánchez *et al.*, 2010).

El genoma de *A. aromaticum* EbN1 también contiene múltiples *clusters* que agrupan genes que podrían estar relacionados con la  $\beta$ -oxidación de ácidos dicarboxílicos, por lo que son candidatos para participar en la degradación del 3-hidroxi-pimelil-CoA generado en la ruta central del benzoil-CoA (Rabus *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia del genoma de *Azoarcus* sp. CIB también ha revelado la presencia de diversas agrupaciones de genes que muestran similitud con los genes *pim*. La existencia de varios *clusters pim* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB podría suponer que alguno de ellos se ha especializado en la conversión del 3-hidroxi-metil-pimelil-CoA a metil-glutaril-CoA (Fig. 50) si bien, como se detalla en párrafos anteriores, la existencia de *clusters pim* relacionados con la degradación de ciertos compuestos aromáticos no excluye la posibilidad de que otros *clusters* similares suplan su función en un momento dado.

El glutaril-CoA sufre una deshidrogenación y una descarboxilación a crotonil-CoA por parte de una actividad glutaril-CoA deshidrogenasa (GcdH), que ha sido caracterizada en *Azoarcus* sp. CIB (Blázquez *et al.*, 2008) y *G. metallireducens* (Wischgoll *et al.*, 2009). En *D. multivorans* la glutaril-CoA deshidrogenasa sólo lleva a cabo la deshidrogenación y se requiere una glutaconil-CoA descarboxilasa adicional para la formación de crotonil-CoA (Wischgoll *et al.*, 2009; Wischgoll *et al.*, 2010). Al contrario de lo que ocurre con los genes que codifican las rutas de  $\beta$ -oxidación de ácidos dicarboxílicos, el gen *gcdH* suele estar presente en el cromosoma de los diferentes microorganismos en una sola copia (Carmona *et al.*, 2009). El producto de la acción de las glutaril-CoA deshidrogenasas descarboxilantes sobre el glutaril-CoA es el crotonil-CoA, que continúa siendo oxidado a través de una  $\beta$ -oxidación de ácidos dicarboxílicos de cadena corta hasta dar lugar a dos moléculas de acetil-CoA (Gallus y Schink, 1994). La cepa *Azoarcus* sp. CIB*gcdH* (mutante por inserción en el gen *gcdH*) es capaz de utilizar *m*-xileno como única fuente de carbono y energía (Blázquez *et al.*, 2008), por lo que el gen *gcdH* no parece estar implicado en la degradación anaeróbica de 3-metilbenzoil-CoA y se postula la existencia de una actividad enzimática específica encargada de la transformación del metil-glutaril-CoA en *Azoarcus* sp. CIB. El análisis de los productos proteicos del *cluster mbd* revela la existencia de una proteína (Orf5) que



**Figura 50. Esquema bioquímico de las dos alternativas propuestas para la ruta baja de degradación anaeróbica del 3MBz en *Azoarcus* sp. CIB.** En el panel **A**) se propone la ruta de degradación en el caso de que el producto de la ruta alta de degradación del 3MBz fuera el 3-hidroxi-6-metil-pimelil-CoA. En el panel **B**) se propone la ruta catabólica en el caso de que el intermediario generado en la ruta alta de degradación del 3MBz fuera el 3-hidroxi-4-metil-pimelil-CoA. Las flechas verdes indican los pasos necesarios para la β-oxidación de ácidos dicarboxílicos de cadena media; las rojas, la actividad (metil)-glutaril-CoA deshidrogenasa (CoA DH); las flechas discontinuas azules indican la β-oxidación de ácidos dicarboxílicos de cadena corta; las flechas discontinuas amarillas indican otras rutas metabólicas que producen 2-pentenil-CoA o 2-metil-crotonil-CoA (tigloil-CoA).



muestra una identidad significativa (~ 30%) con enzimas glutaril-CoA deshidrogenasas de distintos microorganismos y que, por tanto, podría ser la encargada de la descarboxilación oxidativa del metil-glutaril-CoA (Fig. 50).

En la Figura 50 se pueden observar los dos productos propuestos resultantes de la oxidación y descarboxilación del metil-glutaril-CoA. La transformación del 4-metil-glutaril-CoA podría generar 2-pentenoil-CoA, molécula identificada como un intermediario de la fermentación de 5-aminovalerato en *Clostridium aminovalericum* (Barker *et al.*, 1987). Por otro lado, la descarboxilación oxidativa del 2-metil-glutaril-CoA daría lugar a 2-metil-crotonil-CoA, un intermediario de la degradación de la isoleucina (Conrad *et al.*, 1974) y de la degradación de ácidos grasos ramificados en las mitocondrias anaerobias (insensibles al cianuro, carecen de la cadena de transporte de electrones) de *Ascaris suum* (Komuniecki *et al.*, 1984; Ma *et al.*, 1993). En ambos casos, la  $\beta$ -oxidación del 2-pentenoil-CoA o del 2-metil-crotonil-CoA generará propionil-CoA y acetil-CoA. Un análisis detallado del *cluster mbd* revela que los productos Orf3/Orf9 (posible enoil-CoA hidratasa), Orf4 (posible hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) y Orf2 (posible  $\beta$ -cetotiolasa) (Tabla 6) podrían ser los encargados dicha  $\beta$ -oxidación (Fig. 50).

El propionil-CoA sufriría sucesivamente una carboxilación para dar lugar a 2-metil-malonil-CoA y, posteriormente, una actividad mutasa dependiente de la vitamina B<sub>12</sub> transferiría el grupo carboxilo al carbono 4, con la consiguiente formación de succinil-CoA, intermediario del metabolismo central (Weissbach *et al.*, 1959; Lengyel *et al.*, 1960). La confirmación experimental de la identidad de los genes implicados en la ruta baja del 3-metilbenzoil-CoA será objeto de estudio en el futuro.

En conclusión, el análisis de los genes catabólicos *mbd* para la degradación anaeróbica de 3MBz en *Azotarcus* sp. CIB que se ha realizado en esta Tesis Doctoral evidencia la existencia de una nueva ruta metabólica central cuyas etapas enzimáticas básicas son análogas a las de la ruta bzd para la degradación anaeróbica del benzoato, pero que difiere de ésta en los intermediarios metabólicos formados y en las enzimas implicadas. En ocasiones las actividades enzimáticas equivalentes de ambas rutas podrían ser intercambiables, pues las proteínas son capaces de reconocer tanto las moléculas derivadas del benzoil-CoA como las procedentes del 3-metilbenzoil-CoA, como es el caso de la benzoil-CoA reductasa BzdNOPQ y la 3-metilbenzoil-CoA reductasa MbdONQP. En otros casos, este intercambio de funciones no sería posible, como ocurre con la benzoato-CoA ligasa BzdA que es incapaz de reconocer el derivado

metilado del benzoato (López-Barragán *et al.*, 2004), mientras que su proteína homóloga, MbdA, puede reconocer tanto el compuesto metilado como el no metilado. Esta posible complementación de funciones a nivel bioquímico se ve, sin embargo, restringida por la regulación transcripcional específica de ambos *clusters*, que sólo se expresan en presencia del derivado CoA específico de cada ruta (ver siguientes apartados).

### 3. Organización transcripcional del *cluster mbd* y estudio de su regulación específica

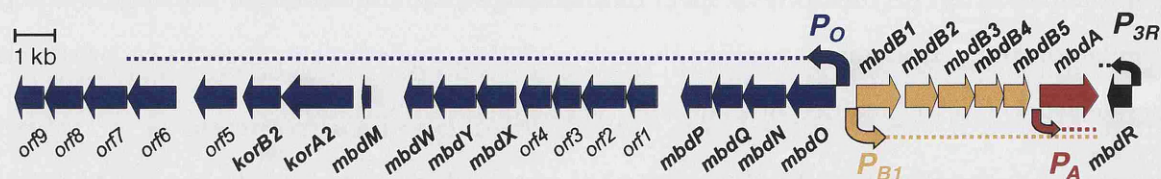
---

El análisis de las capacidades que tienen las bacterias para emplear compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía ha de conjugar el estudio de las reacciones bioquímicas necesarias para el catabolismo con el de los mecanismos de regulación necesarios para que las actividades enzimáticas apropiadas se expresen. A pesar de que la regulación de un proceso metabólico puede ejercerse a través de diferentes niveles de control (transcripcional, traduccional y post-traduccional) en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la regulación a nivel transcripcional, que constituye el mecanismo más común, o al menos el más estudiado por ser el primer nivel de regulación, para el control de la expresión de los *clusters* catabólicos de compuestos aromáticos (Shingler, 2003; Tropel y van der Meer 2004; Díaz y Prieto, 2000; Carmona *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2009).

#### 3.1. Organización transcripcional del *cluster mbd*

El análisis de la organización de los genes *mbd* en el genoma de *Azoarcus* sp. CIB sugería la existencia de, al menos, dos operones catabólicos divergentes, *mbdO-orf9* y *mbdB1-mbdA*, y de un gen regulador, *mbdR*, que se transcribiría en orientación contraria al operón *mbdB1-mbdA* (Fig. 18). Esta organización se corroboró de forma experimental y se confirmó la inducción de los operones *mbd* cuando *Azoarcus* sp. CIB utilizaba 3MBz como única fuente de carbono (Fig. 18). Mediante experimentos de RT-PCR en los que se comparaba la expresión de los operones catabólicos en *Azoarcus* sp. CIB y *Azoarcus* sp. CIBd*mbdR*, se comprobó que *mbdR* codificaba un represor transcripcional específico del *cluster mbd* (Fig. 22). Además, el análisis *in silico* del *cluster mbd* y el posterior estudio experimental permitieron detectar un tercer operón catabólico que integra exclusivamente al gen *mbdA*, y que por tanto sería solapante con el operón *mbdB1-mbdA*.

En la Figura 51 se muestra un esquema resumen de la organización transcripcional del *cluster mbd*.



**Figura 51. Esquema de la organización transcripcional del *cluster mbd* de *Azoarcus* sp. CIB.** Los promotores que se han identificado aparecen representados con flechas curvadas. Las flechas correspondientes a los promotores divergentes  $P_O$  y  $P_{B1}$  se muestran en color azul y amarillo, y las que representan a los promotores  $P_A$  y  $P_{3R}$  en rojo y negro, respectivamente. La longitud del transcrito deducida de los experimentos de RT-PCR se indica con una línea punteada del mismo color que el promotor correspondiente.

Mediante experimentos de extensión por cebador (*primer extension*) se determinó el punto de inicio de la transcripción en los promotores que controlan la expresión de los cuatro operones (Figs. 19, 36, 38). Mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en los que se utilizaron fusiones traduccionales con el gen testigo *lacZ*, así como mediante experimentos de RT-PCR y *primer extension*, se concluyó que los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$  eran inducibles cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultivaba en presencia de 3MBz (Figs. 18, 19 y 21). Experimentos similares mostraron que  $P_A$  y  $P_{3R}$  eran promotores débiles y de expresión básicamente constitutiva en las condiciones de estudio, si bien se observó un ligero incremento en la actividad de  $P_{3R}$  cuando las células se cultivaban en presencia de 3MBz (Fig. 38).

La organización del *cluster mbd* en el cromosoma de *Azoarcus* sp. CIB difiere de la del *cluster bzd* del propio microorganismo. Mientras que en el *cluster bzd* los genes catabólicos y de transporte se disponen en un único operón que codifica la ruta central del benzoil-CoA y la ruta periférica del benzoato (gen *bzdA*; López-Barragán *et al.*, 2004), en el caso del *cluster mbd* existen dos operones divergentes controlados por los promotores  $P_O$  y  $P_{B1}$ . El operón controlado por el promotor  $P_O$  agrupa a todos los genes que codifican la ruta central del 3-metilbenzoil-CoA: a) las cuatro subunidades de la reductasa, b) las tres actividades encargadas de la  $\beta$ -oxidación modificada del producto de la reducción del anillo, y c) un sistema KGOR de dos componentes (tipo *Thauera*) y la ferredoxina que aporta los electrones a la reductasa. En el operón controlado por  $P_O$  se localizan además dos grupos de genes que podrían codificar actividades necesarias para la ruta baja del 3-metilbenzoil-CoA. Por otro lado, el operón controlado por el promotor  $P_{B1}$  codifica la ruta periférica del 3MBz que incluye al presunto transportador



de 3MBz y la 3MBz-CoA ligasa. Dado que el gen *mbdA* posee además su propio promotor ( $P_A$ ) y que el gen que codifica la benzoato-CoA ligasa de la ruta periférica del benzoato no se encuentra ligado a los genes de la ruta central del benzoil-CoA en algunos microorganismos tales como cepas de los géneros *Magnetospirillum* y *Thauera*, (Fig. 5), podría pensarse que el operón *mbdB1-mbdA* que codifica la ruta periférica del 3MBz en *Azotarcus* sp. CIB, haya sido el resultado de la adquisición independiente de los genes *mbdB1-B5* por un lado y del gen *mbdA*, por otro.

### 3.2. Identificación del regulador transcripcional específico del cluster *mbd* y de su molécula inductora

El análisis de la secuencia del producto del gen *mbdR* reveló su pertenencia a la familia TetR de reguladores transcripcionales (para revisión, Ramos *et al.*, 2005 y Yu *et al.*, 2010). El 80% de los genomas de bacterias secuenciados hasta la fecha codifica, al menos, un regulador del tipo TetR, lo que hace que esta familia de reguladores transcripcionales sea la tercera más frecuente en bacterias (Yu *et al.*, 2010).

La familia TetR toma su nombre del regulador transcripcional TetR que controla la expresión de los genes *tet*, que confieren resistencia a la tetraciclina en *E. coli* (George y Levy, 1983). La familia TetR se encuentra distribuida prácticamente en todos los grupos taxonómicos bacterianos, tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, y forma parte de los circuitos de regulación que controlan una gran variedad de procesos celulares, tales como los de diferenciación celular, virulencia y *quorum-sensing* (Ramos *et al.*, 2005). La proteína TetR ha sido caracterizada a nivel genético y bioquímico (Tovar *et al.*, 1988; Hillen y Berens, 1994; Hinrichs *et al.*, 1994). Su mecanismo de acción consiste en la unión al DNA en una región palindrómica operadora específica del promotor, lo que bloquea la unión de la RNA polimerasa impidiendo la transcripción (Bertrand *et al.*, 1983; Orth *et al.*, 2000). Las estructuras tridimensionales elucidadas hasta el momento (Tabla 7) indican que las proteínas de la familia TetR forman dímeros (Yu *et al.*, 2010), si bien su interacción con el promotor que controlan puede originar la formación de tetrámeros, que son en realidad la asociación de dos dímeros, como ocurre con la proteína QacR (Schumacher *et al.*, 2002), la cual reconoce dos secuencias palindrómicas en el promotor sobre el que actúa. Los experimentos de ultracentrifugación analítica realizados con la proteína MbdR purificada revelaron una conformación nativa dimérica para la proteína en solución (Fig. 26).

Regulador	PDB	Microorganismo	Proceso fisiológico que regula	Efecto(es)	Referencia
TetR (ACQ41966)	2XB5	<i>Escherichia coli</i> (G-, γ-proteobacteria)	Resistencia a la tetraciclina	Tetraciclina	Kisker <i>et al.</i> , 1995 Orth <i>et al.</i> , 1999
QacR (ADK23698)	1J16	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+, Firmicutes)	Resistencia a múltiples drogas	Compuestos lipofílicos catiónicos (rodamina, eritro, cristal violeta, etc.)	Schumacher <i>et al.</i> , 2001 Murray <i>et al.</i> , 2004
CprB (BAA28748)	1UI5	<i>Streptomyces coelicolor</i> (G+, Actinobacteria)	Diferenciación morfológica y producción de antibióticos	γ-butirolactonas	Natsume <i>et al.</i> , 2004
YihR (P96222)	1I56	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (G+, Actinobacteria)	Resistencia a la etionamida	Desconocido	Dover <i>et al.</i> , 2004 Pérez <i>et al.</i> , 2004
CgmR (BAC00006)	2ZCY	<i>Corynebacterium glutamicum</i> (G+, Actinobacteria)	Resistencia a múltiples drogas	Bromuro de eritro, azul de metileno	Ito <i>et al.</i> , 2005 Ito <i>et al.</i> , 2010
YfiR (BAA24458)	1RKT	<i>Bacillus subtilis</i> (G+, Firmicutes)	Desconocido	Desconocido	Rajan <i>et al.</i> , 2006
HlyH (AAO74585)	2FX0	<i>Bacillus cereus</i> (G+, Firmicutes)	Producción de hemolisina II	Desconocido	Kovalsky <i>et al.</i> , 2007
TigR (AAK15050)	2UXO	<i>Pseudomonas putida</i> (G-, γ-proteobacteria)	Resistencia a antibióticos	Antibióticos, flavonoides y solventes orgánicos que posean al menos un anillo aromático (tetraciclina, quercetina, floretina, etc.)	Alguet <i>et al.</i> , 2007
HapR (ABD24298)	2PBX	<i>Vibrio cholerae</i> (G-, γ-proteobacteria)	Procesos de virulencia y formación de biofilmes	Desconocido	De Silva <i>et al.</i> , 2007
CmeR (AAS91369)	2QCO	<i>Campylobacter jejuni</i> (G-, e-proteobacteria)	Resistencia a diversos agentes antimicrobianos	Compuestos biliares (taurodesoxicolato, colato, etc.)	Ciu <i>et al.</i> , 2007
Tm1030 (AAD36107)	1Z77	<i>Thermotoga maritima</i> (G-, Thermotogae)	Respuesta a choque térmico	Desconocido	Koclega <i>et al.</i> , 2007
AcrR (CAA07628)	2QOP	<i>Escherichia coli</i> (G-, γ-proteobacteria)	Resistencia a antibióticos	Rodamina, bromuro de eritro, proflavina	Li <i>et al.</i> , 2007
SCO332 (CAB56137)	2ZB9	<i>Streptomyces coelicolor</i> (G+, Actinobacteria)	Desconocido	Desconocido	Okada <i>et al.</i> , 2008
IcaR (AAQ88119)	2ZCM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+, Firmicutes)	Formación de biofilmes	Gentamicina, estreptomicina	Jeng <i>et al.</i> , 2008
SmeI (AAS21046)	2W53	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (G-, γ-proteobacteria)	Resistencia a múltiples drogas	Desconocido	Hernández <i>et al.</i> , 2009
TetR (ABK72312)	2V57	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (G+, Actinobacteria)	Resistencia a diversos agentes antimicrobianos	Compuestos antimicrobianos (proflavina, bromuro de eritro, rodamina, etc.)	Bellinzoni <i>et al.</i> , 2009

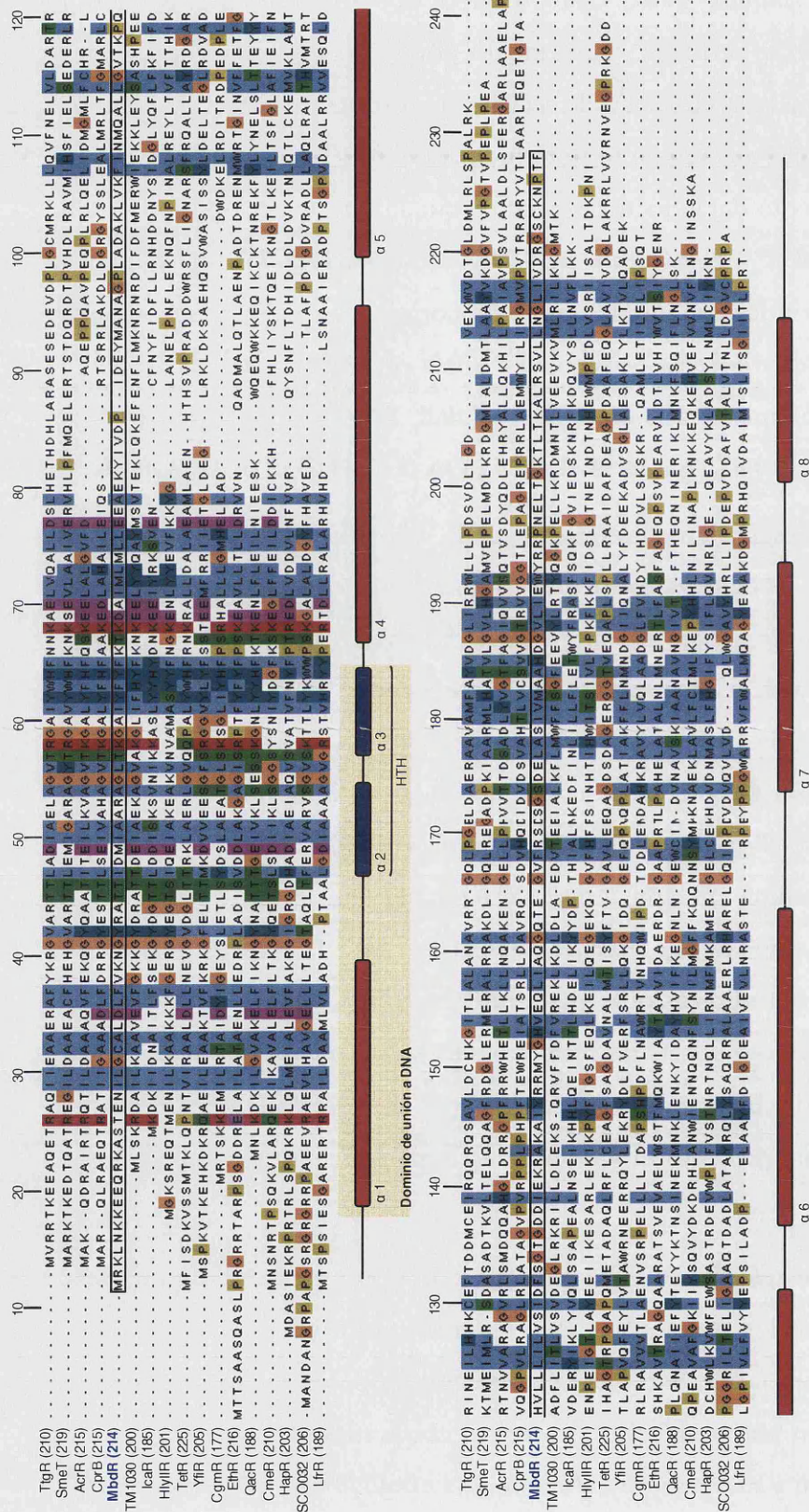
**Tabla 7. Reguladores de la familia TetR cristalizados.** En la tabla se muestran las proteínas de la familia TetR (junto a su código de GenBank), listadas en función de la fecha de la publicación de su estructura 3D. Se indica el código PDB (*Protein Data Bank*) de la estructura 3D, y el nombre del microorganismo al que pertenecen, así como el del filo en el que se incluye la especie. También aparece reflejado el proceso fisiológico controlado por el regulador así como su efecto(es) específico, en el caso de que se conozca.

Los reguladores de la familia TetR están típicamente constituidos por nueve hélices alfa, de las cuáles las tres primeras constituyen la región de unión al DNA, en la que se encuentra el dominio HTH (Yu *et al.*, 2010). Esta región es la más conservada entre los distintos miembros de la familia TetR, tanto a nivel de estructura primaria como terciaria. El dominio carboxilo-terminal, conformado por las hélices alfa que siguen al dominio HTH, presenta una baja identidad de secuencia entre las proteínas de la familia TetR, y se ha postulado como una región importante para el proceso de dimerización de la proteína y el reconocimiento del inductor específico que inhibe su acción represora de la transcripción (Hinrichs *et al.*, 1994; Orth *et al.*, 1998). En ocasiones, los reguladores de la familia TetR pueden reconocer un amplio rango de compuestos, tal y como se puede observar en la Tabla 7. Cada molécula de regulador suele presentar una cavidad para la unión con el ligando, la cual posee una cierta flexibilidad, tiene forma triangular y está definida por las hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$  (Alguel *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).

En la Figura 52 se presenta un alineamiento de la secuencia de la proteína MbdR con proteínas de la familia TetR cuya estructura tridimensional se conoce. La proteína MbdR posee una estructura de hélices alfa arquetípica de la familia de reguladores TetR. Podemos observar la elevada conservación de la secuencia de aminoácidos en el extremo amino-terminal de la proteína, en el cual se encuentran las tres hélices alfa necesarias para la interacción del regulador con el DNA a través de una estructura de tipo HTH (hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ). Por el contrario, la región carboxilo-terminal está mucho menos conservada; su presunta función estaría relacionada con la dimerización de la proteína y el reconocimiento de su efector específico, el 3-metilbenzoil-CoA. La predicción de la estructura tridimensional de MbdR realizada con el programa 3D-Jigsaw (Fig. 23B) sólo permite modelar las primeras seis hélices alfa de la proteína, con lo que no disponemos de un modelo tridimensional completo que nos permita reconstruir *in silico* el homodímero MbdR y tratar de delimitar su sitio de interacción con el efector.

Los experimentos de retardo en gel realizados con la proteína MbdR purificada sobre sondas que contenían los promotores  $P_O$  y  $P_{B_I}$  mostraron una interacción directa entre el regulador y los promotores, con unas  $K_d$  estimadas de  $\sim 1.8$  nM para MbdR- $P_O$  y  $\sim 3.7$  nM para MbdR- $P_{B_I}$  en las condiciones de ensayo empleadas. Algunos reguladores, tales como TetR, se unen a su operador, *tetO*, con una afinidad de 1 nM, mientras que





**Figura 52. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de MbdR y de los reguladores de la familia TetR que han sido cristalizados.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de MbdR (azul) y de las proteínas de la familia TetR que aparecen listadas en la Tabla 7. Las secuencias fueron alineadas empleando la aplicación de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y se presentan según el formato Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). Junto al nombre de cada proteína se indica entre paréntesis su tamaño (en número de aminoácidos). Los aminoácidos se indican con el código estándar de una sola letra. Los aminoácidos conservados aparecen sombreados según el código de colores empleado por ClustalX, interfaz gráfica de ClustalW, ver tabla que acompaña al pie de la figura. En la parte inferior de la figura se muestra una predicción de las hélices alfa que constituyen la estructura secundaria de MbdR, las cuales se han identificado con el programa PSIPred (Bryson *et al.*, 2005). Las hélices sombreadas en amarillo se corresponden con la presunta región de unión a DNA de la proteína, y las coloreadas en azul constituyen el dominio HTH incluido en esta región.

Código de color Clustal X		
Residuo	Color	{Residuo, Grupo de Residuos}
A, I, L, M, F, W, Y	BLUE	{+60%, WLVMACHP}
R, K	RED	{+60%, KR, (+80%, K, R, Q)}
N	GREEN	{+50%, N, (+85%, N, Y)}
C	BLUE	{+60%, WLVMACHP}
C	PINK	{100%, C}
Q	GREEN	{+60%, KR, (+50%, QE), (+85%, Q, E, K, R)}
E	MAGENTA	{+60%, KR, (+50%, QE), (+85%, E, Q, D)}
D	MAGENTA	{+60%, KR, (+85%, K, R, Q), (+50%, ED)}
G	ORANGE	{+40%, G}
H, Y	CYAN	{+60%, WLVMACHP}, (+85%, W, Y, A, C, P, Q, F, H, I, L, M, V)}
P	YELLOW	{+40%, P}
S, T	GREEN	{+60%, WLVMACHP}, (+50%, TS), (+85%, S, T)}

otros miembros de la familia como Sco4025 y Sco7222 presentan unas afinidades inferiores por sus respectivos promotores (para revisión ver Ramos *et al.*, 2005 y Yu *et al.*, 2010). Mediante experimentos de protección frente a la digestión por DNasa I (*footprinting*) se determinó la región de interacción (operadora) de MbdR, la cual solapa con la caja -10 y la región de inicio de la transcripción en el promotor  $P_O$  y con las cajas -10 y -35 en el promotor  $P_{BI}$ . La huella de protección identificada mediante los experimentos de *footprinting* estaba centrada en dos secuencias palindrómicas de 4 nt separadas por 10 nt: ATAC-[10 nt]-GTAT. En la Tabla 8 podemos observar una comparación de las secuencias palindrómicas incluidas en las diferentes regiones operadoras que son reconocidas por proteínas de la familia TetR. Las secuencias palindrómicas de reconocimiento oscilan entre 12 pb (Sco7704, EF0787) y 30 pb (QacR, ADK23698). La secuencia reconocida por QacR representa una excepción para la mecánica de interacción entre una proteína de la familia TetR y su operador específico, puesto que contiene una secuencia palindrómica muy extendida que a su vez posee dos secuencias internas parcialmente palindrómicas (Tabla 8). Dado que de los reguladores de tipo TetR conocidos sólo QacR y CgmR interaccionan con el DNA mediante la unión de dos dímeros (Schumacher *et al.*, 2001; Itou *et al.*, 2005), siendo las secuencias de DNA necesarias para dicho reconocimiento de 26 y 30 pb respectivamente, y dado que la secuencia palindrómica reconocida por MbdR tiene una longitud (18 pb) similar a la longitud promedio de las secuencias reconocidas por los reguladores TetR (Tabla 8), podemos sugerir que la interacción de MbdR con el DNA tiene lugar mediante la unión específica de un solo homodímero del regulador. En este contexto, la aparición del Complejo I MbdR- $P_O/P_{BI}$  (Fig. 28) podría explicarse como un estado de transición en el que una sola molécula de MbdR se ha unido a una de las mitades de la secuencia palindrómica.

La secuencia operadora de MbdR se usó para la búsqueda *in silico* de secuencias homólogas en el *cluster mbd*. Se detectó una posible secuencia palindrómica de reconocimiento de MbdR en la región situada entre los genes *mbdB1* y *mbdA* (ATAC-[10 nt]-GTAC) y varias secuencias análogas en el promotor  $P_{3R}$ , siendo la más conservada de ellas AGAC-[9 nt]-GTAC (Figs. 36C y 38C). Mediante experimentos de retardo en gel se confirmó la existencia de una interacción específica entre la proteína MbdR y los promotores  $P_A$  ( $K_d \sim 5.9$  nM) (Fig. 37) y  $P_{3R}$  (Fig. 39). En el caso del promotor  $P_{3R}$ , se observaron numerosas bandas de retardo, lo que estaría de acuerdo con la existencia de varias regiones operadoras para MbdR en dicho promotor (Fig. R38C), aunque la



afinidad de la interacción (~100 nM para que el 50% de la sonda forme algún complejo de unión) era claramente inferior a la observada en los promotores  $P_O$ ,  $P_{BI}$  y  $P_{AI}$ . Los experimentos de *footprinting* confirmaron la unión de la proteína MbdR a la secuencia operadora predicha en el promotor  $P_{AI}$ . Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos de retardo en gel se procedió a realizar ensayos de protección frente a la digestión por DNasa I en el promotor  $P_{JR}$ , pero resultó imposible detectar huellas de protección o regiones de hipersensibilidad a la digestión (datos no mostrados). En el futuro se optimizarán las condiciones de *footprinting* para tratar de identificar las huellas de protección de MbdR en el promotor  $P_{JR}$ . La existencia de un promotor,  $P_{I}$ , que presenta bajos niveles de actividad y dirige en exclusiva la transcripción del gen *mbdA* pero que, sin embargo, también interacciona con MbdR, junto con la existencia de diversas cajas operadoras para el regulador en el promotor  $P_{JR}$  que controla su propia transcripción, plantea la existencia de un complejo circuito regulador estrechamente dependiente de las variaciones de concentración de MbdR y de la estequiometría de la interacción con su inductor específico.

Regulador	Secuencia palindrómica	Longitud total (pb)	Longitud espaciador (pb)	Referencia
MbdR	ATACnnnnnnnnnGTAT	18	10	-
TetR	TCTATCA <sub>n</sub> TGATAGA	15	1	Orh <i>et al.</i> , 2000
EthR	TCAACnnnnnGTCGA	15	5	Engohang-Ndong <i>et al.</i> , 2004
CprB	CGGGAnnnTCCAG	13	3	Sugiyama <i>et al.</i> , 1998
YdcE	AACGGTnnnnACAGTT	16	4	(a)
YblJ	TTAATCAAnnnnTTGATTAA	20	4	(a)
YstA/YerO	AAATGAA <sub>n</sub> nnnnATTTCATT	18	4	(a)
BC5000	AAACTAA <sub>n</sub> nnnnATTAGTTT	19	3	(a)
PsrA	CAAACAnnnTGTGTG	14	2	(a)
PA3133	AGGGCCATTC <sub>n</sub> nnnnnGGAATGGCCCT	27	5	(a)
RHA1 <sub>ro</sub> 04212	GGTGAAnnnnnnTTTACC	18	6	(a)
Rha06780	TCC <sub>n</sub> TACAnnnCGTAGAG	16	2	(a)
DhaS	GGACACA <sub>n</sub> nnnnnATTGTCC	22	6	Christen <i>et al.</i> , 2006
QacR	TTATAGACCGATCGATCGGCTATAA (2D)	26	0	Schumacher <i>et al.</i> , 2002
CgmR	GTAACGTGACCGAnnnnTCGTTACAGTTAC (2D)	30	4	Ito <i>et al.</i> , 2005
Hly11R	TTTAAAnnnnnnTTTAAA	19	7	Budanina <i>et al.</i> , 2004
EF0787	TTTA <sub>n</sub> InAAAAA	11	1	(a)
Rha04620	AAATCGAAnnnnnTTTCGATT	19	5	(a)
Sc07704	CGAACnnGTTCCG	12	2	(a)
PksA	GCGCACnnnnnnnnGTGCGC	20	8	(a)
RHA1 <sub>ro</sub> 03468	TTGTTGTG <sub>n</sub> nnnACAAACAA	19	3	(a)
Sc07222	TGGAACGnCGTTCCA	15	1	(a)
PhaD	TTTAGAnnnnnnnTCTAAA	20	8	(a)

**Tabla 8. Regiones palindrómicas reconocidas por diferentes proteínas reguladoras de la familia TetR.** La tabla refleja las secuencias de DNA palindrómicas reconocidas específicamente por varias proteínas de la familia TetR de reguladores transcripcionales en las correspondientes regiones operadoras. Los nucleótidos localizados entre las secuencias palindrómicas se representan mediante “n”. La longitud total de la región y la del espaciador situado entre las secuencias palindrómicas se indica en pares de bases (pb). Los palíndromos señalados como 2D son reconocidos por dos dímeros de la proteína reguladora, ya que están constituidos, a su vez, por dos palíndromos menos conservados y situados en cada mitad de la región palindrómica completa. Las secuencias palindrómicas no validadas experimentalmente se identifican como (a) y fueron propuestas por Yu *et al.*, (2010).



Los reguladores transcripcionales que controlan la expresión de las rutas catabólicas de degradación de compuestos aromáticos suelen interactuar específicamente con una molécula inductora que habitualmente es un metabolito perteneciente a la propia ruta (para revisión ver Carmona *et al.*, 2008). El 3MBz se consideró primeramente la molécula candidata para ser el inductor del *cluster mbd*, pero los experimentos *in vivo* de actividad de  $P_{B1}$  (Fig. 30A) descartaban esta hipótesis. Dado que en la ruta bzd para la degradación anaeróbica de benzoato en *Azoarcus* sp. CIB (López-Barragán *et al.*, 2004) se ha identificado un regulador transcripcional, BzdR, que reconoce de forma específica benzoil-CoA, el intermediario metabólico principal de la ruta (Barragán *et al.*, 2005), se trató de determinar si el 3-metilbenzoil-CoA podría cumplir esta función en el *cluster mbd*. Experimentos *in vivo* de expresión de la fusión traduccional  $P_{B1}::lacZ$  estaban de acuerdo con esta hipótesis (Fig. 30B). Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos con los sistemas *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* de interacción DNA-proteína entre MbdR y los promotores del *cluster mbd*. Los experimentos de retardo en gel (Figs. 28, 32, 37 y 39), protección frente a la digestión por la DNasa I (Figs. 29 y 37) y transcripción *in vitro* (Fig. 33) mostraron que la interacción específica de los promotores con el regulador MbdR se impedía específicamente en presencia de 3-metilbenzoil-CoA, pero no en presencia de otros análogos tales como fenilacetil-CoA, benzoil-CoA, o compuestos no conjugados con CoA tales como el 3MBz. Aunque se había propuesto que el regulador PhaD de *Pseudomonas putida* KT2442 (también perteneciente a la familia TetR) reconoce un hidroxiaclil-CoA como inductor (de Eugenio *et al.*, 2010), los estudios realizados en esta Tesis con MbdR y el 3-metilbenzoil-CoA suponen la primera demostración experimental de la interacción entre un regulador de la familia TetR y un compuesto derivado de CoA.

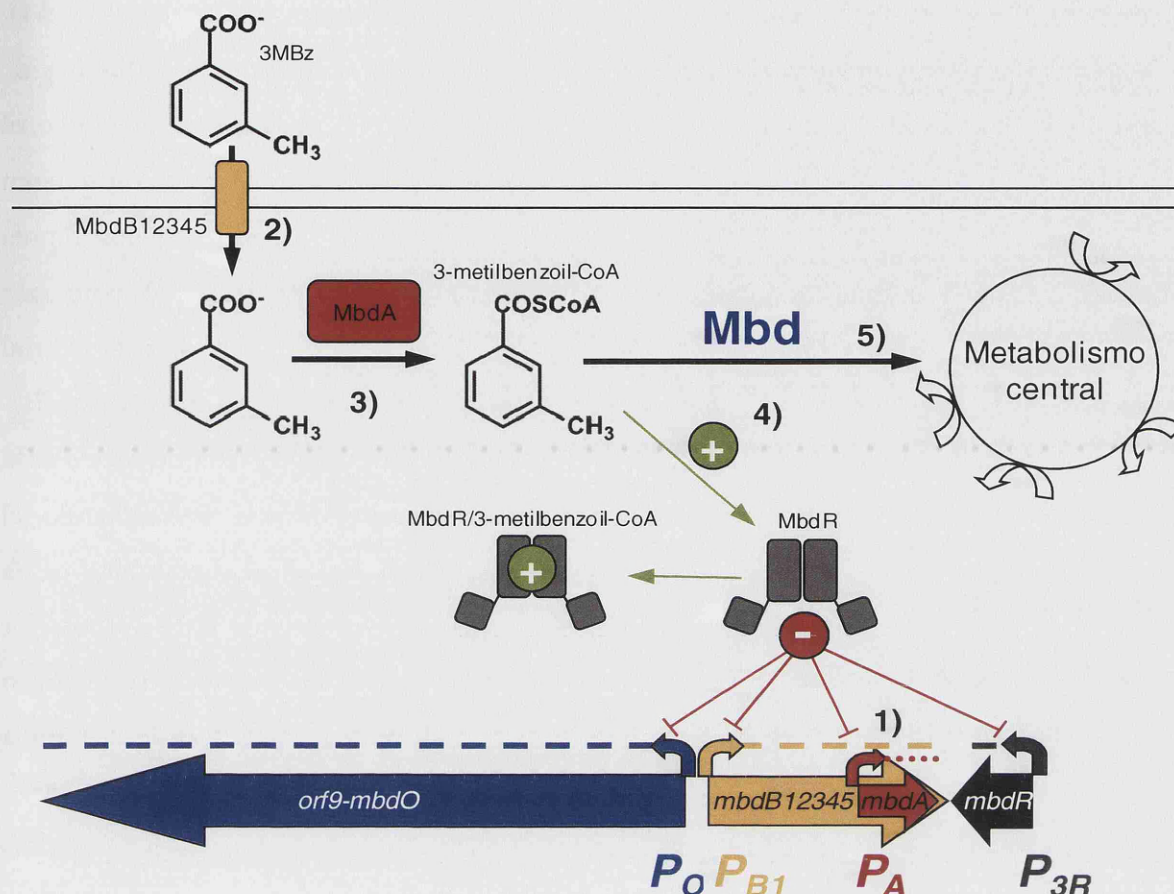
La inducción de una ruta catabólica central por el intermediario en el que convergen distintas rutas periféricas se ha hipotetizado como un mecanismo de control adicional que evitaría la expresión de un gran número de genes catabólicos necesarios para la degradación de un compuesto aromático por parte de análogos del mencionado compuesto aromático que no son canalizados hasta dicha ruta central (Carmona *et al.*, 2009). En el caso concreto que nos ocupa, la inducción de los genes *mbd* por 3-metilbenzoil-CoA y no por los sustratos aromáticos que son canalizados hasta este intermediario central, por ejemplo *m*-xileno y 3MBz, evita que otros análogos como tolueno y benzoato, puedan activar la ruta *mbd* de forma gratuita. En *Azoarcus* sp. CIB

la ruta periférica de degradación del *m*-xileno (y tolueno) está controlada por un sistema regulador de dos componentes, llamado TdiSR (Blázquez, 2009). La histidín-quinasa sensora TdiS detecta el 3-metilbencilsuccinato (bencilsuccinato), primer intermediario de la ruta, y fosforila a la proteína reguladora TdiR, la cual actúa como un activador de la transcripción de los genes *bss-bbs* indispensables para el crecimiento de la bacteria en anaerobiosis empleando *m*-xileno (y tolueno) como única fuente de carbono. Los genes *bss-bbs* codifican las actividades enzimáticas necesarias para la conversión del *m*-xileno en 3-metilbenzoil-CoA. Cuando se alcanza una concentración determinada de 3-metilbenzoil-CoA en el interior de la bacteria, bien sea por la degradación del *m*-xileno o por la activación directa del 3MBz por parte de la proteína MbdA, cesa la represión que MbdR ejerce sobre los promotores del *cluster mbd*, permitiendo la expresión de las actividades enzimáticas necesarias para el catabolismo anaeróbico del 3-metilbenzoil-CoA y su incorporación al metabolismo central.

### 3.3. Modelo de la regulación transcripcional específica del *cluster mbd*

La integración de los diferentes resultados obtenidos en esta Tesis permite proponer un modelo de la regulación transcripcional específica del *cluster mbd*. Los promotores  $P_O$  y  $P_{B_I}$  son los responsables de la transcripción de todos los genes catabólicos y de transporte del *cluster mbd*. Dado que su activación supone la producción de, al menos, 23 productos proteicos, su actividad está regulada de forma estricta por el represor MbdR. La presencia de 3-metilbenzoil-CoA en la célula permitiría la liberación de la proteína MbdR unida a los promotores  $P_O$  y  $P_{B_I}$ , los cuales iniciarían la expresión de los genes catabólicos *mbd*, lo que permitiría el catabolismo del 3-metilbenzoil-CoA hasta su incorporación al metabolismo central de la bacteria.

En este circuito regulador, la producción de una cierta cantidad de 3-metilbenzoil-CoA es clave para iniciar la activación del sistema. La expresión del gen *mbdA*, codificante de la proteína necesaria para la activación del 3MBz y la formación del inductor 3-metilbenzoil-CoA, está dirigida por dos promotores,  $P_{B_I}$  y  $P_A$ . La actividad del promotor  $P_A$  ensayada en las mismas condiciones que la del promotor  $P_{B_I}$  es unas 20 veces inferior. Los experimentos de retardo en gel y de protección frente a la digestión por DNasa I evidencian que ambos promotores están controlados por MbdR y que las interacciones MbdR- $P_{B_I}$  y MbdR- $P_A$  tienen lugar con unas  $K_d$  similares ( $\sim 3.7$  nM para  $P_{B_I}$  y  $\sim 5.9$  nM para  $P_A$ ). También se ha observado que una cepa mutante por inserción



**Figura 53. Esquema del modelo propuesto para la inducción específica de la expresión del cluster *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB cuando la bacteria crece anaeróbicamente en 3MBz. (1)** En ausencia de 3MBz, el regulador MbdR mantendría reprimidos (líneas rojas) a los promotores  $P_O$ ,  $P_{B1}$  y, parcialmente, a  $P_A$  y  $P_{3R}$ . En presencia de 3MBz, la expresión basal de los genes de transporte (*mbdB1-B5*) y del gen *mbdA* a partir de los promotores  $P_{B1}$  y  $P_A$ , respectivamente, permitiría su entrada en la célula (2) y la formación de una cierta cantidad del inductor 3-metilbenzoil-CoA (3). La presencia de 3-metilbenzoil-CoA en el interior de la célula permitiría su interacción con el represor MbdR, desbloqueando la expresión (flechas verdes) de los genes catabólicos (ruta central) a partir del promotor  $P_O$  (línea discontinua azul) y la de los genes de transporte (línea discontinua amarilla) y activación (línea punteada roja) a partir de los promotores  $P_{B1}$  y  $P_A$  (4).

en el gen *mbdB1* (*Azoarcus* sp. CIB*dmdbB1*), el primer gen del operón *mbdB1B2B3B4B5mbdA*, es incapaz de crecer anaeróbicamente empleando 3MBz como única fuente de carbono, si bien es capaz de utilizar *m*-xileno. Posteriormente se comprobó que si se complementaba la cepa mutante con un plásmido que expresaba el gen *mbdA* el fenotipo revertía y la cepa era capaz de crecer de nuevo en 3MBz. Estos resultados sugerían que los efectos polares de la mutación en el gen *mbdB1* afectaban a la expresión del gen *mbdA* y que la expresión a partir del promotor  $P_{B1}$  es esencial para el crecimiento en 3MBz. En este sentido, la transcripción del gen *mbdA* a partir del promotor  $P_A$  en exclusiva muy probablemente no sea suficiente para proporcionarle a la célula los niveles de MbdA necesarios para el crecimiento en 3MBz. Aunque el

promotor  $P_A$  posee una secuencia operadora para MbdR muy conservada (Fig. 34), mantiene su actividad cuando *Azoarcus* sp. CIB se cultiva anaeróticamente en fuentes de carbono no inductoras, tales como el benzoato (Fig. 36). Se podría proponer que el promotor  $P_A$  ha evolucionado para mantener unos niveles basales de expresión del gen *mbdA* que permitan que, tras la entrada de 3MBz a la célula, se produzca una rápida respuesta a nivel regulador, generándose el 3-metilbenzoil-CoA necesario para que MbdR cese su represión sobre la expresión de los genes catabólicos de la ruta central necesarios para degradar el 3-metilbenzoil-CoA y sobre los genes de transporte (*mbdB1-B5*) y el propio gen *mbdA* de la ruta periférica, lo que facilitaría la entrada de más 3MBz al interior celular y su posterior activación a 3-metilbenzoil-CoA, favoreciendo el consumo del mismo. En la Figura 53 se esquematiza la situación metabólica de la bacteria cuando encuentra 3MBz en el medio de cultivo. La entrada de 3MBz al interior de la bacteria podría producirse de forma facilitada, ya que en el *cluster mbd* se incluyen los genes *mbdB12345* que codifican un presunto transportador específico de la familia ABC (*ATP-Binding Cassette*) (Fath y Kolter, 1993; Davidson *et al.*, 2008; Kos *et al.*, 2009). La presencia de genes codificantes de sistemas transportadores asociados a los *clusters* para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos es frecuente en muchos géneros bacterianos, como *Azoarcus*, *Aromatoleum*, *Rhodopseudomonas*, *Magnetospirillum* y *Geobacter* (para revisión ver Carmona *et al.*, 2009). A pesar de este hecho, hasta la fecha todavía no se han realizado estudios en profundidad encaminados a la caracterización de estos sistemas transportadores.

Por otro lado, el promotor  $P_{JR}$  también parece estar regulado por la propia proteína MbdR, ya que su actividad es ligeramente mayor cuando las células se cultivan en 3MBz (Fig. 38) y se ha demostrado la formación de complejos MbdR- $P_{JR}$  mediante ensayos *in vitro* de retardo en gel (Fig. 39). Sin embargo, la afinidad que muestra MbdR por el promotor  $P_{JR}$  es sensiblemente inferior a la que muestra por  $P_O$ ,  $P_{BI}$  y  $P_A$ . El promotor  $P_{JR}$  posee una posible secuencia operadora para MbdR solapante con la caja -10, y además dispone de otras cuatro posibles secuencias operadoras situadas aguas arriba de la caja -35 (Fig. 38C). La caja operadora situada entre las secuencias -10 y -35 sería necesaria para que MbdR ejerciera un efecto represor sobre su propia expresión, tal y como ocurre con muchos otros reguladores, como por ejemplo BzdR, que reprime el operón catabólico *bzd* para la degradación anaeróbica del benzoato y también su propia expresión (Durante-Rodríguez *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce el papel que pueden jugar las diferentes cajas operadoras de MbdR localizadas en la región 5' de  $P_{JR}$ ,

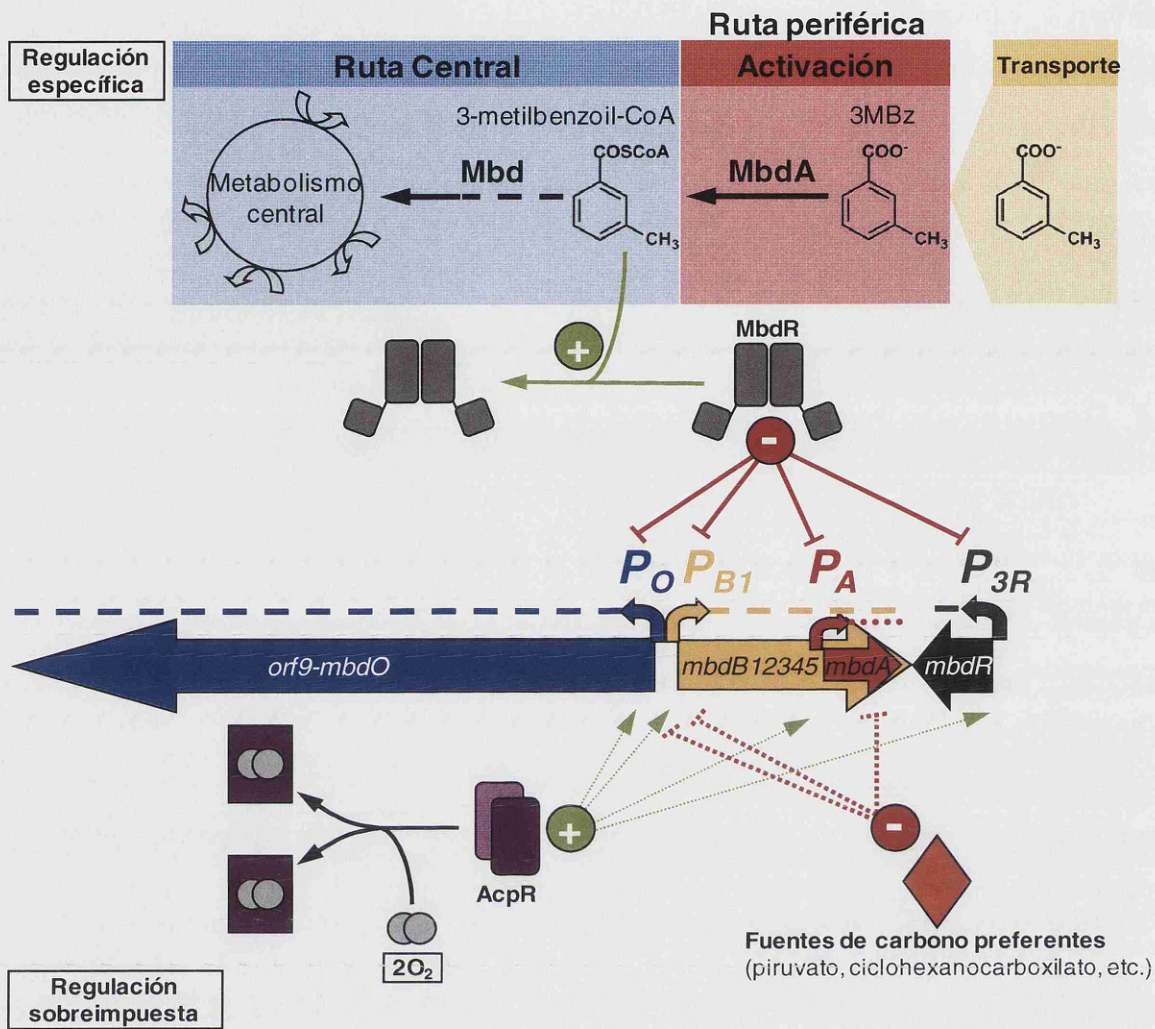
si bien su naturaleza degenerada respecto a la secuencia consenso, ATAC-[10 b]-GTAT, sugiere que la interacción con dichas cajas sólo se produciría a elevadas concentraciones de MbdR, lo que facilitaría la autorregulación de la proteína reguladora, de tal forma que cuando en la célula hubiera un exceso de regulador bajaría su nivel de expresión. El estudio detallado de la autorregulación del gen *mbdR* y del control del promotor  $P_A$  serán objeto de trabajo en el futuro.

#### 4. Regulación transcripcional sobreimpuesta del *cluster mbd*

Como se ha comentado en la *Introducción*, las bacterias son capaces de detectar un gran número de señales externas que ejercen un papel importante sobre su fisiología. Algunas de estas señales, como por ejemplo la presencia/ausencia de oxígeno o la existencia de fuentes preferenciales de carbono, tienen una gran repercusión en el metabolismo bacteriano. Entre los sistemas que tienen las células para integrar esta información y modificar su metabolismo destacan los reguladores globales de la transcripción, capaces de ejercer su influencia sobre un gran número de *clusters* catabólicos y otros genes reguladores.

La expresión del *cluster mbd* está modulada, al igual que ocurre en muchos otros *clusters* para el catabolismo de compuestos aromáticos, por la presencia de fuentes preferenciales de carbono. El esfuerzo energético necesario para la biodegradación anaeróbica de los compuestos aromáticos, sumado al gran número de productos proteicos necesarios para este catabolismo, hace que la represión de los *clusters* catabólicos sea una herramienta fundamental para que las bacterias ahorren recursos en situaciones en las que en el medio está presente la fuente de carbono aromática junto a otra fuente de carbono cuya incorporación al metabolismo central es más eficiente. Mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en los que se analizaba la actividad del promotor  $P_{BI}$  en *Azoarcus* sp. CIB, se observó que algunas fuentes de carbono (casaminoácidos, piruvato y ciclohexanocarboxilato) ocasionaban represión catabólica sobre el promotor mientras que otras no lo hacían (benzoato, alanina y glutarato) (Fig. 40). Debido a que  $P_O$  y  $P_{BI}$  son ambos promotores que controlan la expresión de sendos operones catabólicos, suponemos que el promotor  $P_O$  se comportará de forma similar a  $P_{BI}$ . Por otro lado, mediante experimentos de RT-PCR se demostró que el promotor  $P_{JR}$ , que dirige la expresión del regulador MbdR, no sufre represión catabólica por parte de fuentes de carbono preferentes como el piruvato (Fig. 41). Esta situación en la que





**Figura 54. Esquema general de los diferentes niveles de regulación, estudiados en esta Tesis, sobre la expresión del cluster *mbd* de *Azoarcus* sp. CIB cuando la bacteria crece anaeróbicamente en 3MBz.** En la mitad superior de la figura se muestra un resumen de la regulación específica (Fig. 53). En la mitad inferior de la figura se muestra la regulación sobreimpuesta dependiente de la presencia/ausencia de oxígeno y fuentes de carbono adicionales. Las flechas verdes indican activación de la transcripción (+), mientras que los martillos rojos señalan represión de la transcripción (-). Las flechas/martillos de línea continua indican una relación directa que se ha comprobado experimentalmente. Las flechas/martillos punteados reflejan que no se ha confirmado experimentalmente el control directo sobre los promotores correspondientes. Los rectángulos morados representan a la proteína AcpR. En ausencia de oxígeno AcpR se comportaría como la proteína Fnr de *E. coli*, dimerizando y activando la transcripción. En presencia de oxígeno, AcpR cambia de conformación, monomeriza, y no es capaz de unirse y activar los promotores correspondientes. El rombo naranja indica un regulador, desconocido hasta la fecha, que responde a fuentes de carbono preferentes y que controla la regulación por catabolito de los genes *mbd*.

los promotores catabólicos son sensibles a la represión por catabolito pero los promotores de los genes reguladores son insensibles a la misma, es paralela a la observada en el cluster *bzd* de *Azoarcus* sp. CIB, en el que el promotor catabólico ( $P_N$ ) sufre represión pero el promotor del regulador, ( $P_R$ ) no la experimenta (López-Barragán *et al.*, 2004; Durante-Rodríguez *et al.*, 2008).



Las evidencias de las que disponemos hasta el momento no permiten afirmar que la represión catabólica de los genes *mbd* sea ejercida de forma directa sobre  $P_{BI}$  y  $P_O$ . Así, no se puede descartar que el promotor  $P_A$ , encargado de la expresión de la enzima que genera el inductor del sistema de regulación específica, sufra también represión por catabolito. Si esto fuera así, los efectos observados sobre el promotor  $P_{BI}$  podrían deberse a la incapacidad de que cese la represión ejercida por MbdR ante la imposibilidad de que se genere suficiente 3-metilbenzoil-CoA que induzca en sistema. El promotor  $P_A$  podría ejercer un papel clave en el control de la expresión de todo el *cluster mbd* y será objeto de estudio en el futuro.

Aunque la base molecular de la represión catabólica todavía es desconocida, en fechas recientes se ha identificado en *Azoarcus* sp. CIB un sistema regulador que parece estar implicado en la represión catabólica de los *clusters* para la degradación anaeróbica de compuestos aromáticos (A. Valderrama, Tesis Doctoral en preparación).

Una de las señales ambientales fundamentales para las bacterias anaerobias facultativas es la presencia o ausencia de oxígeno. Estas bacterias viven en medios en los que se producen variaciones en la tensión de oxígeno y, por tanto, han de responder rápidamente expresando rutas aeróbicas o anaeróbicas. La proteína AcpR juega un papel fundamental en la expresión dependiente de oxígeno del *cluster bzd* de *Azoarcus* sp. CIB, actuando como un activador imprescindible del promotor catabólico  $P_N$  en condiciones anóxicas (Durante-Rodríguez *et al.*, 2006). De la misma forma, un mutante en el gen *acpR*, *Azoarcus* sp. CIB $\Delta$ *acpR*, es incapaz de utilizar 3MBz anaeróbicamente, lo que confirma que la expresión de los genes *mbd* es dependiente de AcpR. El análisis de la actividad de los promotores  $P_O$ ,  $P_{BI}$  y  $P_{JR}$  mediante experimentos de RT-PCR revela que ésta disminuye en la cepa *Azoarcus* sp. CIB $\Delta$ *acpR* en comparación con la cepa parental *Azoarcus* sp. CIB (Fig. 42). Sin embargo, el control ejercido por AcpR sobre los promotores  $P_O$  y  $P_{BI}$  podría ser indirecto. Las fusiones traduccionales  $P_O::lacZ$  y  $P_{BI}::lacZ$  muestran una gran actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos aeróbicos de *E. coli* (~5000 y ~1000 Unidades Miller, respectivamente), lo que denota que no existe una dependencia tan estricta de la ausencia de oxígeno para la activación de dichos promotores. Por otro lado, en los experimentos de transcripción *in vitro* de los promotores  $P_O$  y  $P_{BI}$  no es necesario añadir Fnr\* (capaz de sustituir *in vitro* a AcpR) para observar formación de transcrito (Fig. 33). Además, estudios preliminares de interacción DNA-proteína indican que Fnr\* no se une de forma eficaz a los promotores  $P_O$  y  $P_{BI}$  (datos no mostrados). Al

igual que se ha indicado para la represión por catabolito, en el futuro se pretende dilucidar la posible interacción de AcpR con  $P_A$ , mecanismo que explicaría el control indirecto de AcpR sobre  $P_O$  y  $P_{BI}$ .

En la Figura 54 se presenta un esquema del modelo global de regulación del *cluster mbd* según los resultados presentados y discutidos en esta Tesis.

## 5. Origen evolutivo del *cluster mbd*

Como hemos podido comprobar en apartados anteriores, las proteínas implicadas en la ruta *mbd* muestran similitud con las proteínas que cumplen una función similar en el metabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros bacterianos como *Azoarcus*, *Thauera*, *Magnetospirillum* y *Rhodopseudomonas*. Este hecho podría sugerir un origen del *cluster mbd* a partir de la transferencia horizontal de diferentes genes o grupos de genes procedentes de bacterias pertenecientes a otros grupos taxonómicos.

El análisis del CAI (*Codon Adaptation Index*; Sharp y Li, 1987) de los genes permite inferir el grado de adaptación del *cluster* al genoma del microorganismo. Según este índice, los valores próximos a 1 revelan una mayor identidad en el uso de codones del gen analizado con el uso de codones promedio del genoma (calculado a partir de todas las ORFs codificantes de proteínas del genoma), lo que sugiere una mayor adaptación al hospedador. La Tabla 9 muestra el CAI de los genes *mbd* (así como el contenido en G+C de cada uno de ellos). Teniendo en cuenta que el %GC de las regiones codificantes de *Azoarcus* sp. CIB es de un 66%, podemos observar que todos los genes del *cluster mbd* se encuentran por debajo de este valor y oscilan entre un 49.1% (*mbdR*) y un 64.9% (*korA2*). Dado que los valores del CAI para los distintos genes *mbd* son significativamente inferiores a los calculados para otros genes de *Azoarcus* sp. CIB (cuyo CAI es superior a 0.76) parece lógico asumir que el *cluster mbd* de *Azoarcus* sp. CIB procede de otro genoma diferente (perteneciente a un microorganismo con un contenido en G+C inferior al de las cepas de los géneros *Thauera*/*Azoarcus*) y que habría sido adquirido por la cepa CIB mediante un proceso de transferencia horizontal de DNA. En este sentido, resultados recientes obtenidos tras el ensamblaje del genoma de *Azoarcus* sp. CIB revelan que el *cluster mbd* se localiza en un elemento integrativo/conjugativo (elemento XTD) que incluiría también al *cluster bss-bbs* (codificante de la ruta periférica del tolueno/*m*-xileno). El análisis del CAI y del contenido en G+C de los

genes del *cluster bss-bbs* (Blázquez, 2009) muestra que éstos están más adaptados al genoma de *Azoarcus* sp. CIB que los del *cluster mbd*. Así, el contenido medio en G+C de los genes *bss-bbs* es de 62%, frente a un 58% del *cluster mbd*. No obstante, los genes *bss-bbs* presentan un valor medio de CAI de 0.65, superior al proedio de los genes *mbd* (0.53) pero inferior al que presentan otros genes de *Azoarcus* sp. CIB (superior a 0.76). Esta disparidad en los valores de CAI de los *clusters bss-bbs* y *mbd* podría sugerir que el *cluster bss-bbs* pasó a integrarse en el elemento XTD procedente de una especie cercana a *Azoarcus* sp. CIB. Una posibilidad es que el elemento XTD portador del *cluster bss-bbs* se integrara en el genoma de una especie del género *Azoarcus* o afín, como *Thauera*, aportándole la capacidad de crecer anaeróbicamente en tolueno, ya que para el crecimiento en esta fuente de carbono no se requiere la ruta *mbd* sino la ruta central del

Nombre	CAI	%GC	Función predicha
<i>orf9</i>	0.43	57.1	Ruta baja: enoil-CoA hidratasa.
<i>orf8</i>	0.39	56.9	Acil-CoA deshidrogenasa
<i>orf7</i>	0.46	59.1	Acil-CoA deshidrogenasa
<i>orf6</i>	0.44	58.1	Acetil-CoA hidrolasa/transferasa
<i>orf5</i>	0.48	59.1	Posible (metil)-glutaril-CoA deshidrogenasa
<i>korB2</i>	0.68	64.3	KGOR subunidad $\beta$
<i>korA2</i>	0.69	64.9	KGOR subunidad $\alpha$
<i>mbdM</i>	0.43	50.8	Ferredoxina
<i>mbdW</i>	0.48	60.4	(metil)-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa
<i>mbdY</i>	0.66	62.5	(metil)-6-oxociclohex-1-eno-1-carbonil-CoA hidrolasa
<i>mbdX</i>	0.61	63.5	(metil)-6-hidroxiciclohex-1-eno-1-carbonil-CoA deshidrogenasa
<i>orf4</i>	0.58	59.6	Ruta baja: enoil-CoA deshidrogenasa.
<i>orf3</i>	0.62	61.0	Ruta baja: enoil-CoA hidratasa.
<i>orf2</i>	0.55	61.4	Ruta baja: $\beta$ -cetotiolasa.
<i>orf1</i>	0.62	56.0	Amidohidrolasa 2
<i>mbdP</i>	0.49	55.5	3-metilbenzoil-CoA reductasa, subunidad $\delta$
<i>mbdQ</i>	0.51	58.4	3-metilbenzoil-CoA reductasa, subunidad $\alpha$
<i>mbdN</i>	0.49	52.7	3-metilbenzoil-CoA reductasa, subunidad $\gamma$
<i>mbdO</i>	0.46	51.7	3-metilbenzoil-CoA reductasa, Subunidad $\beta$
<i>mbdB1</i>	0.58	60.4	Transportador ABC, subunidad periplásmica
<i>mbdB2</i>	0.51	57.5	Transportador ABC, subunidad transmembrana
<i>mbdB3</i>	0.57	59.2	Transportador ABC, subunidad transmembrana
<i>mbdB4</i>	0.52	60.4	Transportador ABC, subunidad ATPasa
<i>mbdB5</i>	0.52	59.5	Transportador ABC, subunidad ATPasa
<i>mbdA</i>	0.50	56.2	3MBz-CoA ligasa
<i>mbdR</i>	0.45	49.1	Regulador transcripcional

**Tabla 9. Comparación del uso de codones de los diferentes genes del *cluster mbd* con el uso de codones promedio del genoma de *Azoarcus* sp. CIB.** La Tabla resume el valor del CAI (Codon Adaptation Index; Sharp y Li, 1987), calculado según se detalla en el apartado correspondiente de *Materiales y Métodos*, para cada gen del *cluster mbd*, tomando como referencia la tabla de uso de codones de todas las *orf* codificantes de proteínas de *Azoarcus* sp. CIB. También se detalla el contenido en G+C (%) para cada gen. El valor de G+C medio de las *orfs* codificantes de *Azoarcus* sp. CIB es de un 66%. Se detalla también la función predicha para cada gen en la ruta *mbd*. Los genes para los que no se ha hipotetizado su función en la ruta *mbd* aparecen en blanco.

benzoil-CoA presente en el genoma de todas estas cepas. Así, *A. aromaticum* EbN1 y *T. aromatica*, por ejemplo, presentan la ruta central para la degradación del benzoil-CoA y la ruta periférica bss-bbs que les permiten degradar tolueno, pero son incapaces de degradar *m*-xileno (Leuthner y Heider, 2000; Kube *et al.*, 2004). En la historia evolutiva del elemento XTD y mediante procesos de transferencia horizontal, éste pudo transferirse a una bacteria perteneciente a un género diferente y que presentase un porcentaje de G+C sensiblemente inferior al de *Azoarcus* o *Thauera*, adquiriendo el *cluster mbd*. En un proceso posterior, el elemento XTD pudo ser transferido a *Azoarcus* sp. CIB aportándole la capacidad de crecimiento anaeróbico en tolueno y *m*-xileno.

Este tipo de elementos génicos móviles constituye un sistema muy eficaz para la transferencia horizontal de información entre diferentes cepas bacterianas. El elemento XTD de *Azoarcus* sp. CIB es el primero que se describe capaz de conferir la capacidad de utilizar anaeróbicamente hidrocarburos aromáticos como el tolueno y el *m*-xileno, y su caracterización detallada está siendo objeto de estudio en la actualidad.

## **VI. CONCLUSIONES**





El trabajo descrito a lo largo de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

- El *cluster mbd*, responsable de la activación del 3MBz y de la degradación anaeróbica del 3-metilbenzoil-CoA en *Ascarus* sp. CIB, se ha identificado y caracterizado. De esta forma se ha descrito una nueva ruta central para el catabolismo anaeróbico de compuestos aromáticos que no había sido identificada hasta la fecha en ningún microorganismo.
- El *cluster mbd* se organiza en, al menos, cuatro operones:
  - a) Un operón (*mbdO-orf9*) que agrupa a los genes catabólicos de la ruta central y, posiblemente, de la ruta baja, controlado por el promotor  $P_O$ .
  - b) Un operón que codifica un presunto sistema de transporte (*mbdB1B2B3B4B5*) y el gen catabólico *mbdA* que interviene en la activación del 3MBz (ruta periférica), controlado por el promotor  $P_{B1}$ .
  - c) Un operón catabólico que contiene en exclusiva el gen *mbdA*, controlado por el promotor  $P_{A1}$ .
  - d) Un operón monocistrónico que contiene el gen regulador *mbdR*, controlado por el promotor  $P_{3R}$ .
- El producto del gen *mbdA*, responsable de la ruta periférica de activación del 3MBz a 3-metilbenzoil-CoA, es la primera 3MBz-CoA ligasa descrita, y define un nuevo grupo de proteínas CoA-ligasas de ácidos aromáticos emparentado con el de las benzoato-CoA ligasas.
- Se ha caracterizado la actividad 3-metilbenzoil-CoA reductasa, que estaría codificada por los genes *mbdONQP* y que supone el paso clave de la degradación anaeróbica del 3-metilbenzoil-CoA puesto que es la encargada de la reducción del anillo aromático. La reductasa MbdONQP representa el primer miembro de un nuevo subgrupo de reductasas que presenta similitud con las benzoil-CoA reductasas dependientes de ATP, y cuyo sistema de aporte de poder reductor estaría constituido por la ferredoxina MbdM y la  $\alpha$ -cetoglutarato óxido-reductasa bicomponente KorA2B2.
- La proteína MbdW purificada es una metil-ciclohexa-1,5-dieno-carbonil-CoA hidratasa responsable del primer paso de la  $\beta$ -oxidación modificada del compuesto alicíclico producto de la reducción del 3-metilbenzoil-CoA.

- El gen *mbdR* codifica un regulador transcripcional de la familia TetR que reprime la expresión de los cuatro operones del *cluster mbd* en ausencia de inductor.
- El represor transcripcional MbdR purificado interactúa con una región operadora palindrómica solapante con la de reconocimiento por parte de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la RNA polimerasa en los promotores  $P_O$ ,  $P_{BI}$ ,  $P_A$  y  $P_{IR}$ .
- El 3-metilbenzoil-CoA es la molécula inductora responsable de la activación de los promotores del *cluster mbd* mediante su interacción con MbdR, el primer miembro de la familia TetR que tiene como molécula inductora un compuesto aromático derivado de CoA.
- La expresión de los genes catabólicos *mbd* está sometida a represión catabólica cuando *Azotarcus* sp. CIB se cultiva en fuentes de carbono preferentes (ácidos orgánicos). Esta regulación sobreimpuesta actúa, al menos, sobre el promotor catabólico  $P_{BI}$  y parece no actuar sobre el promotor regulador  $P_{IR}$ .
- Otro sistema de regulación sobreimpuesta que responde a la presencia/ausencia de oxígeno controla la actividad de los promotores  $P_O$ ,  $P_{BI}$  y  $P_{IR}$ , y está mediado, de forma directa o indirecta, por el activador transcripcional AcpR.
- El análisis del contenido en G+C y el uso de codones de los genes *mbd*, así como la localización de éstos en un elemento integrativo/conjugativo, sugiere su adquisición por *Azotarcus* sp. CIB mediante transferencia génica horizontal y como un mecanismo de adaptación a nuevas fuentes de carbono tales como *m*-xileno y 3MBz.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- **Achong, G.R., Rodríguez, A.M. y Spormann, A.M. (2001).** Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J Bacteriol* 183, 6763-6770.
- **Adler, E. (1977).** Lignin chemistry past, present and future. *Wood Science and Technology* 11, 169-218.
- **Alguel, Y., Meng, C., Teran, W., Krell, T., Ramos, J.L., Gallegos, M.T. y Zhang, X. (2007).** Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J Mol Biol* 369, 829-840.
- **Altenschmidt, U. y Fuchs, G. (1992).** Novel aerobic 2-aminobenzoate metabolism. Purification and characterization of 2-aminobenzoate-CoA ligase, localisation of the gene on a 8-kbp plasmid, and cloning and sequencing of the gene from a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Eur J Biochem* 205, 721-727.
- **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- **Anders, H.J., Kaetzke, A., Kampfer, P., Ludwig, W. y Fuchs, G. (1995).** Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov. y *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 45, 327-333.
- **Armengaud, J., Timmis, K.N. y Wittich, R.M. (1999).** A functional 4-hydroxysalicylate/hydroxyquinol degradative pathway gene cluster is linked to the initial dibenzo-*p*-dioxin pathway genes in *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J Bacteriol* 181, 3452-3461.
- **Auburger, G. y Winter, J. (1996).** Activation and degradation of benzoate, 3-phenylpropionate and crotonate by *Syntrophus buswellii* strain GA. Evidence for electron-transport phosphorylation during crotonate respiration. *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 807-815.
- **Bains, J. y Boulanger, M.J. (2007).** Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate CoA ligases from *Burkholderia xenovorans* LB400:

defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway. *J Mol Biol* 373, 965-977.

- **Barker, H.A., D'Ari, L. y Kahn, J. (1987).** Enzymatic reactions in the degradation of 5-aminovalerate by *Clostridium aminovalericum*. *J Biol Chem* 262, 8994-9003.
- **Barragán, M.J., Blázquez, B., Zamarro, M.T., Mancheño, J.M., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2005).** BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J Biol Chem* 280, 10683-10694.
- **Bellinzoni, M., Buroni, S., Schaeffer, F., Riccardi, G., De Rossi, E. y Alzari, P.M. (2009).** Structural plasticity and distinct drug-binding modes of LfrR, a mycobacterial efflux pump regulator. *J Bacteriol* 191, 7531-7537.
- **Bertani, G. (2004).** Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* 186, 595-600.
- **Bertrand, K.P., Postle, K., Wray, L.V., Jr. y Reznikoff, W.S. (1983).** Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene* 23, 149-156.
- **Beuerle, T. y Pichersky, E. (2002).** Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme a esters. *Anal Biochem* 302, 305-312.
- **Biegert, T., Altenschmidt, U., Eckerskorn, C. y Fuchs, G. (1993).** Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoate-CoA ligase from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 213, 555-561.
- **Blázquez, B. (2009).** Caracterización molecular de la degradación anaeróbica de tolueno y *m*-xileno en *Azoarcus* sp. CIB. Tesis Doctoral (Universidad Complutense de Madrid).
- **Blázquez, B., Carmona, M., García, J.L. y Díaz, E. (2008).** Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ Microbiol* 10, 474-482.
- **Boll, M. (2005a).** Dearomatizing benzene ring reductases. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10, 132-142.



- **Boll, M. (2005b).** Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim Biophys Acta* 1707, 34-50.
- **Boll, M. y Fuchs, G. (1995).** Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur J Biochem* 234, 921-933.
- **Boll, M. y Fuchs, G. (1998).** Identification and characterization of the natural electron donor ferredoxin and of FAD as a possible prosthetic group of benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. *Eur J Biochem* 251, 946-954.
- **Boll, M., Fuchs, G. y Heider, J. (2002).** Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* 6, 604-611.
- **Borejsza-Wysocki, W. y Hrazdina, G. (1996).** Aromatic polyketide synthases (purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits). *Plant Physiol* 110, 791-799.
- **Brackmann, R. y Fuchs, G. (1993).** Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 213, 563-571.
- **Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- **Breese, K., Boll, M., Alt-Mörbe, J., Schägger, H. y Fuchs, G. (1998).** Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 256, 148-154.
- **Brodskii, L.I., Ivanov, V.V., Kalaïdzidis, I.L., Leontovich, A.M., Nikolaev, V.K., Feranchuk, S.I. y Drachev, V.A. (1995).** [GeneBee-NET: An Internet based server for biopolymer structure analysis]. *Biokhimiia* 60(8):1221-1230.
- **Bryson, K., McGuffin, L.J., Marsden, R.L., Ward, J.J., Sodhi, J.S. y Jones, D.T. (2005).** Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 33, W36-38.

- Budarina, Z.I., Nikitin, D.V., Zenkin, N., Zakharova, M., Semenova, E., Shlyapnikov, M.G., Rodikova, E.A., Masyukova, S., Ogarkov, O., Baida, G.E., Solonin, A. S. y Severinov, K. (2004). A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II. *Microbiology* 150, 3691-3701.
- Busch, A., Lacal, J., Martos, A., Ramos, J.L. y Krell, T. (2007). Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13774-13779.
- Butler, J.E., He, Q., Nevin, K.P., He, Z., Zhou, J. y Lovley, D.R. (2007). Genomic and microarray analysis of aromatics degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics* 8, 180.
- Canosa, I., Sánchez-Romero, J.M., Yuste, L. y Rojo, F. (2000). A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Mol Microbiol* 35, 791-799.
- Carmona, M. y Díaz, E. (2005). Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Mol Microbiol* 58, 1210-1215.
- Carmona, M., Prieto, M.A., Galán, B., García, J.L. y Díaz, E. (2008). Signalling networks and design of pollutant biosensors, p. 97-103. En E. Díaz (ed.), *Microbial Biodegradation: genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido.
- Carmona, M., Zamarro, M.T., Blázquez, B., Durante-Rodríguez, G., Juárez, J.F., Valderrama, J.A., Barragán, M.J., García, J.L. y Díaz, E. (2009). Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 71-133.
- Casadaban, M.J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage *lambda* and *Mu*. *J Mol Biol* 104, 541-555.
- Cases, I. y de Lorenzo, V. (2001). The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J* 20, 1-11.

- **Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005a).** Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat Rev Microbiol* 3, 105-118.
- **Cases, I. y de Lorenzo, V. (2005b).** Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. *Int Microbiol* 8, 213-222.
- **Chakraborty, R. y Coates, J.D. (2004).** Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 437-446.
- **Chee-Sanford, J.C., Frost, J.W., Fries, M.R., Zhou, J. y Tiedje, J.M. (1996).** Evidence for acetyl coenzyme A and cinnamoyl coenzyme A in the anaerobic toluene mineralization pathway in *Azoarcus toluolyticus* Tol-4. *Appl Environ Microbiol* 62, 964-973.
- **Christen, S., Srinivas, A., Bahler, P., Zeller, A., Pridmore, D., Bieniossek, C., Baumann, U. y Erni, B. (2006).** Regulation of the Dha operon of *Lactococcus lactis*: a deviation from the rule followed by the TetR family of transcription regulators. *J Biol Chem* 281, 23129-23137.
- **Coates, J.D., Bhupathiraju, V.K., Achenbach, L.A., McLnerney, M.J. y Lovley, D.R. (2001).** *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbiciae*, three new, strictly anaerobic, dissimilatory Fe(III)-reducers. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 581-588.
- **Coates, J.D., Chakraborty, R. y McInerney, M.J. (2002).** Anaerobic benzene biodegradation--a new era. *Res Microbiol* 153, 621-628.
- **Collier, D.N., Hager, P.W. y Phibbs, P.V., Jr. (1996).** Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res Microbiol* 147, 551-561.
- **Conrad, R.S., Massey, L.K. y Sokatch, J.R. (1974).** D- and L-isoleucine metabolism and regulation of their pathways in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 118, 103-111.
- **Coschigano, P.W. (2000).** Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* strain T1. *Appl Environ Microbiol* 66, 1147-1151.

- **Coschigano, P.W. (2002).** Construction and characterization of insertion/deletion mutations of the *tutF*, *tutD*, and *tutG* genes of *Thauera aromatica* strain T1. FEMS Microbiol Lett 217, 37-42.
- **Coschigano, P.W. y Bishop, B.J. (2004).** Role of benzylsuccinate in the induction of the *tutE tutFDGH* gene complex of *T. aromatica* strain T1. FEMS Microbiol Lett 231, 261-266.
- **Coschigano, P.W., Wehrman, T.S. y Young, L.Y. (1998).** Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. Appl Environ Microbiol 64, 1650-1656.
- **Crosby, H.A., Heiniger, E.K., Harwood, C.S. y Escalante-Semerena, J.C. (2010).** Reversible *N epsilon*-lysine acetylation regulates the activity of acyl-CoA synthetases involved in anaerobic benzoate catabolism in *Rhodopseudomonas palustris*. Mol Microbiol 76, 874-888.
- **Daniels, C., Godoy, P., Duque, E., Molina-Henares, M.A., de la Torre, J., Del Arco, J.M., Herrera, C., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Ferrer, M. y Ramos, J. L (2010).** Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J Bacteriol 192, 2169-2181.
- **Darley, P.I., Hellstern, J.A., Medina-Bellver, J.I., Marqués, S., Schink, B. y Philipp, B. (2007).** Heterologous expression and identification of the genes involved in anaerobic degradation of 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) in *Azoarcus anaerobius*. J Bacteriol 189, 3824-3833.
- **Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C. y Chen, J. (2008).** Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. Microbiol Mol Biol Rev 72, 317-364.
- **de Eugenio, L.I., Galán, B., Escapa, I.F., Maestro, B., Sanz, J.M., García, J.L. y Prieto, M.A. (2010).** The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. Environ Microbiol 12, 1591-1603.
- **de Lorenzo, V. (2008).** Systems biology approaches to bioremediation. Curr Opin Biotechnol 19, 579-589.

- **de Lorenzo, V. y Pérez-Martín, J. (1996).** Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol Microbiol* 19, 1177-1184.
- **de Lorenzo, V. y Timmis, K.N. (1994).** Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235, 386-405.
- **De Silva, R.S., Kovacicova, G., Lin, W., Taylor, R.K., Skorupski, K. y Kull, F.J. (2007).** Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J Bacteriol* 189, 5683-5691.
- **Díaz, E. (2004).** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int Microbiol* 7, 173-180.
- **Díaz, E. y Prieto, M.A. (2000).** Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* 11, 467-475.
- **Dimroth, P. y Schink, B. (1998).** Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch Microbiol* 170, 69-77.
- **Dispensa, M., Thomas, C.T., Kim, M.K., Perrotta, J.A., Gibson, J. y Harwood, C.S. (1992).** Anaerobic growth of *Rhodospseudomonas palustris* on 4-hydroxybenzoate is dependent on AadR, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *J Bacteriol* 174, 5803-5813.
- **Dombroski, A.J. (1997).** Recognition of the -10 promoter sequence by a partial polypeptide of sigma70 in vitro. *J Biol Chem* 272, 3487-3494.
- **Dörner, E. y Boll, M. (2002).** Properties of 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from *Thauera aromatica* and its role in enzymatic reduction of the aromatic ring. *J Bacteriol* 184, 3975-3983.
- **Dover, L.G., Corsino, P.E., Daniels, I.R., Cocklin, S.L., Tatituri, V., Besra, G.S. y Futterer, K. (2004).** Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. *J Mol Biol* 340, 1095-1105.
- **Durante-Rodríguez, G., Valderrama, J.A., Mancheño, J.M., Rivas, G., Alfonso, C., Arias-Palomo, E., Llorca, O., García, J.L., Díaz, E. y**

- Carmona, M. (2010).** Biochemical characterization of the transcriptional regulator BzdR from *Azoarcus* sp. CIB. *J Biol Chem* 285, 35694-35705.
- **Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M.T., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2006).** Oxygen-dependent regulation of the central pathway for the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. strain CIB. *J Bacteriol* 188, 2343-2354.
  - **Durante-Rodríguez, G., Zamarro, M.T., García, J.L., Díaz, E. y Carmona, M. (2008).** New insights into the BzdR-mediated transcriptional regulation of the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB. *Microbiology* 154, 306-316.
  - **Ebenau-Jehle, C., Boll, M. y Fuchs, G. (2003).** 2-Oxoglutarate:NADP(+) oxidoreductase in *Azoarcus evansii*: properties and function in electron transfer reactions in aromatic ring reduction. *J Bacteriol* 185, 6119-6129.
  - **Egland, P.G., Gibson, J. y Harwood, C.S. (1995).** Benzoate-coenzyme A ligase, encoded by *badA*, is one of three ligases able to catalyze benzoyl-coenzyme A formation during anaerobic growth of *Rhodopseudomonas palustris* on benzoate. *J Bacteriol* 177, 6545-6551.
  - **Egland, P.G. y Harwood, C.S. (1999).** BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *J Bacteriol* 181, 2102-2109.
  - **Egland, P.G. y Harwood, C.S. (2000).** HbaR, a 4-hydroxybenzoate sensor and FNR-CRP superfamily member, regulates anaerobic 4-hydroxybenzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 182, 100-106.
  - **Egland, P.G., Pelletier, D.A., Dispensa, M., Gibson, J. y Harwood, C.S. (1997).** A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6484-6489.
  - **Elshahed, M.S., Bhupathiraju, V.K., Wofford, N.Q., Nanny, M.A. y McInerney, M.J. (2001).** Metabolism of benzoate, cyclohex-1-ene carboxylate, and cyclohexane carboxylate by "*Syntrophus aciditrophicus*" strain SB in syntrophic association with H<sub>2</sub>-using microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67, 1728-1738.



- **Elshahed, M.S. y McInerney, M.J. (2001).** Benzoate fermentation by the anaerobic bacterium *Syntrophus aciditrophicus* in the absence of hydrogen-using microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67, 5520-5525.
- **Engohang-Ndong, J., Baillat, D., Aumercier, M., Bellefontaine, F., Besra, G.S., Locht, C. y Baulard, A.R. (2004).** EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* 51, 175-188.
- **Evans, W.C. y Fuchs, G. (1988).** Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 42, 289-317.
- **Fath, M.J. y Kolter, R. (1993).** ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57, 995-1017.
- **Fernández, S., de Lorenzo, V. y Perez-Martín, J. (1995).** Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol Microbiol* 16, 205-213.
- **Ferrández, A., Miñambres, B., García, B., Olivera, E.R., Luengo, J.M., García, J.L. y Díaz, E. (1998).** Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem* 273, 25974-25986.
- **Foght, J. (2008).** Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15, 93-120.
- **Frénois, F., Engohang-Ndong, J., Locht, C., Baulard, A.R. y Villeret, V. (2004).** Structure of EthR in a ligand bound conformation reveals therapeutic perspectives against tuberculosis. *Mol Cell* 16, 301-307.
- **Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. y Tiedje, J.M. (1994).** Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* 60, 2802-2810.
- **Fu, Z., Wang, M., Paschke, R., Rao, K.S., Freman, F.E. y Kim, J.J. (2004).** Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions. *Biochemistry* 43, 9674-9684.

- **Fuchs, G. (2008).** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 82-99.
- **Gallus, C. y Schink, B. (1994).** Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology* 140 ( Pt 2), 409-416.
- **García-Bernardo, J., Xiang, L., Hong, H., Moore, B.S., and Leadlay, P.F. (2004).** Engineered biosynthesis of phenyl-substituted polyketides. *Chembiochem* 5, 1129-1131.
- **Geissler, J.F., Harwood, C.S. y Gibson, J. (1988).** Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodospseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *J Bacteriol* 170, 1709-1714.
- **George, A.M. y Levy, S.B. (1983).** Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* 155, 541-548.
- **Gerhardt, P. (1994).** Methods for general and molecular bacteriology (Washington, D.C., American Society for Microbiology).
- **Gescher, J., Eisenreich, W., Worth, J., Bacher, A. y Fuchs, G. (2005).** Aerobic benzoyl-CoA catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: studies on the non-oxygenolytic ring cleavage enzyme. *Mol Microbiol* 56, 1586-1600.
- **Gescher, J., Ismail, W., Ölgeschläger, E., Eisenreich, W., Wörth, J. y Fuchs, G. (2006).** Aerobic benzoyl-coenzyme A (CoA) catabolic pathway in *Azoarcus evansii*: conversion of ring cleavage product by 3,4-dehydroadipyl-CoA semialdehyde dehydrogenase. *J Bacteriol* 188, 2919-2927.
- **Gescher, J., Zaar, A., Mohamed, M., Schagger, H. y Fuchs, G. (2002).** Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* 184, 6301-6315.
- **Gibson, D.T. y Parales, R.E. (2000).** Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11, 236-243.
- **Gibson, J. y Harwood C.S.. (2002).** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 56, 345-369.

- **Gibson, J., Dispensa, M., Fogg, G.C., Evans, D.T. y Harwood, C.S. (1994).** 4-Hydroxybenzoate-coenzyme A ligase from *Rhodopseudomonas palustris*: purification, gene sequence, and role in anaerobic degradation. *J Bacteriol* 176, 634-641.
- **Gibson, K.J. y Gibson, J. (1992).** Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *Appl Environ Microbiol* 58, 696-698.
- **Gomes, B., Fendrich, G. y Abeles, R.H. (1981).** Mechanism of action of glutaryl-CoA and butyryl-CoA dehydrogenases. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* 20, 1481-1490.
- **Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J.F., 3rd, Tiedje, J.M. y Vandamme, P. (2004).** Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1677-1681.
- **Green, J., Scott, C. y Guest, J.R. (2001).** Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv Microb Physiol* 44, 1-34.
- **Gu, R., Su, C.C., Shi, F., Li, M., McDermott, G., Zhang, Q. y Yu, E.W. (2007).** Crystal structure of the transcriptional regulator CmeR from *Campylobacter jejuni*. *J Mol Biol* 372, 583-593.
- **Hall, T.A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 91-98.
- **Harayama, S. y Rekik, M. (1989).** Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J Biol Chem* 264, 15328-15333.
- **Harayama, S. y Timmis, K.N. (1989).** Catabolism of aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas*, p. 151-174. En D.A. Hopwood (ed.). *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press Inc., Nueva York, E.E.U.U.
- **Harayama, S. y Timmis, K.N. (1992).** Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. 28, p. 99-156. En H. Sigel y A. Sigel (eds.), *Metal ions in biological systems*. Marcel Dekker, Nueva York.

- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rossello-Mora, R. y Widdel, F. (1999). Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65, 999-1004.
- Harrison, F.H. y Harwood, C.S. (2005). The *pimFABCDE* operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiology* 151, 727-736.
- Harwood, C.S., Burchhardt, G., Herrmann, H. y Fuchs, G. (1999). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 439-458.
- Harwood, C.S. y Gibson, J. (1986). Uptake of benzoate by *Rhodopseudomonas palustris* grown anaerobically in light. *J Bacteriol* 165, 504-509.
- Harwood, C.S. y Parales, R.E. (1996). The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 50, 553-590.
- Heider, J. (2007). Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 11, 188-194.
- Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., Mohamed, M.E., Schneider, S., Burchhardt, G. y Fuchs, G. (1998). Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch Microbiol* 170, 120-131.
- Heider, J. y Fuchs, G. (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243, 577-596.
- Heintz, D., Gallien, S., Wischgoll, S., Ullmann, A.K., Schaeffer, C., Kretzschmar, A.K., van Dorsselaer, A. y Boll, M. (2009). Differential membrane proteome analysis reveals novel proteins involved in the degradation of aromatic compounds in *Geobacter metallireducens*. *Mol Cell Proteomics* 8, 2159-2169.
- Hermuth, K., Leuthner, B. y Heider, J. (2002). Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch Microbiol* 177, 132-138.

- **Hernández, A., Mate, M.J., Sánchez-Díaz, P.C., Romero, A., Rojo, F. y Martínez, J.L. (2009).** Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J Biol Chem* 284, 14428-14438.
- **Hess, A., Zarda, B., Hahn, D., Haner, A., Stax, D., Hohener, P. y Zeyer, J. (1997).** *In situ* analysis of denitrifying toluene- and *m*-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl Environ Microbiol* 63, 2136-2141.
- **Hillen, W. y Berens, C. (1994).** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- **Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W. y Saenger, W. (1994).** Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* 264, 418-420.
- **Itou, H., Okada, U., Suzuki, H., Yao, M., Wachi, M., Watanabe, N. y Tanaka, I. (2005).** The CGL2612 protein from *Corynebacterium glutamicum* is a drug resistance-related transcriptional repressor: structural and functional analysis of a newly identified transcription factor from genomic DNA analysis. *J Biol Chem* 280, 38711-38719.
- **Itou, H., Watanabe, N., Yao, M., Shirakihara, Y. y Tanaka, I. (2010).** Crystal structures of the multidrug binding repressor *Corynebacterium glutamicum* CgmR in complex with inducers and with an operator. *J Mol Biol* 403, 174-184.
- **Iwabuchi, T. y Harayama, S. (1998).** Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J Biol Chem* 273, 8332-8336.
- **Jeng, W.Y., Ko, T.P., Liu, C.I., Guo, R.T., Liu, C.L., Shr, H.L. y Wang, A.H. (2008).** Crystal structure of IcaR, a repressor of the TetR family implicated in biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *Nucleic Acids Res* 36, 1567-1577.
- **Kawaguchi, K., Shinoda, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2006).** Purification and characterization of benzoate-CoA ligase from *Magnetospirillum* sp. strain TS-6 capable of aerobic and anaerobic degradation of aromatic compounds. *FEMS Microbiol Lett* 257, 208-213.

- **Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K., Hillen, W. y Saenger, W. (1995).** The complex formed between Tet repressor and tetracycline-Mg<sup>2+</sup> reveals mechanism of antibiotic resistance. *J Mol Biol* 247, 260-280.
- **Koclega, K.D., Chruszcz, M., Zimmerman, M.D., Cymborowski, M., Evdokimova, E. y Minor, W. (2007).** Crystal structure of a transcriptional regulator TM1030 from *Thermotoga maritima* solved by an unusual MAD experiment. *J Struct Biol* 159, 424-432.
- **Komuniecki, R., Rioux, A. y Thissen, J. (1984).** NADH-dependent tiglyl-CoA reduction in disrupted mitochondria of *Ascaris suum*. *Mol Biochem Parasitol* 10, 25-32.
- **Körner, H., Sofia, H.J. y Zumft, W.G. (2003).** Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27, 559-592.
- **Kos, V. y Ford, R.C. (2009).** The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 66, 3111-3126.
- **Kovalevskiy, O.V., Lebedev, A.A., Surin, A.K., Solonin, A.S. y Antson, A.A. (2007).** Crystal structure of *Bacillus cereus* HlyIIR, a transcriptional regulator of the gene for pore-forming toxin hemolysin II. *J Mol Biol* 365, 825-834.
- **Krieger, C.J., Beller, H.R., Reinhard, M. y Spormann, A.M. (1999).** Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *J Bacteriol* 181, 6403-6410.
- **Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kühner, S., Beck, A., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2004).** Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 181, 182-194.
- **Kühner, S., Wöhlbrand, L., Fritz, I., Wruck, W., Hultschig, C., Hufnagel, P., Kube, M., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2005).** Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J Bacteriol* 187, 1493-1503.



- **Kung, J.W., Löffler, C., Dörner, K., Heintz, D., Gallien, S., Van Dorsselaer, A., Friedrich, T. y Boll, M. (2009).** Identification and characterization of the tungsten-containing class of benzoyl-coenzyme A reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17687-17692.
- **Kuntze, K., Shinoda, Y., Moutakki, H., McInerney, M.J., Vogt, C., Richnow, H.H. y Boll, M. (2008).** 6-Oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-coenzyme A hydrolases from obligately anaerobic bacteria: characterization and identification of its gene as a functional marker for aromatic compounds degrading anaerobes. *Environ Microbiol* 10, 1547-1556.
- **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- **Laempe, D., Eisenreich, W., Bacher, A. y Fuchs, G. (1998).** Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA hydratase [corrected], an enzyme involved in anaerobic metabolism of benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 255, 618-627.
- **Laempe, D., Jahn, M., Breese, K., Schägger, H. y Fuchs, G. (2001).** Anaerobic metabolism of 3-hydroxybenzoate by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 183, 968-979.
- **Laempe, D., Jahn, M. y Fuchs, G. (1999).** 6-Hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur J Biochem* 263, 420-429.
- **Larimer, F.W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M.L., Pelletier, D.A., Beatty, J.T., Lang, A.S., Tabita, F. R., Gibson, J. L., Hanson, T. E., Bobst, C., Torres, J. L., Peres, C., Harrison, F. H., Gibson, J. y Harwood, C. S. (2004).** Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nat Biotechnol* 22, 55-61.
- **Lau, P.C., Wang, Y., Patel, A., Labbe, D., Bergeron, H., Brousseau, R., Konishi, Y. y Rawlings, M. (1997).** A bacterial basic region leucine zipper

- histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1453-1458.
- **Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M. y Pelletier, S.L. (1992).** Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
  - **Lengyel, P., Mazumder, R. y Ochoa, S. (1960).** Mammalian methylmalonyl isomerase and Vitamin B(12) coenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 1312-1318.
  - **Leuthner, B. y Heider, J. (2000).** Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of beta oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J Bacteriol* **182**, 272-277.
  - **Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schagger, H. y Heider, J. (1998).** Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol* **28**, 615-628.
  - **Leutwein, C. y Heider, J. (2001).** Succinyl-CoA:(R)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J Bacteriol* **183**, 4288-4295.
  - **Leutwein, C. y Heider, J. (2002).** (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Arch Microbiol* **178**, 517-524.
  - **Li, L., Patterson, D.P., Fox, C.C., Lin, B., Coschigano, P.W. y Marsh, E.N. (2009).** Subunit structure of benzylsuccinate synthase. *Biochemistry* **48**, 1284-1292.
  - **Li, M., Gu, R., Su, C.C., Routh, M.D., Harris, K.C., Jewell, E.S., McDermott, G. y Yu, E.W. (2007).** Crystal structure of the transcriptional regulator AcrR from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **374**, 591-603.
  - **Li, M., Qiu, X., Su, C.C., Long, F., Gu, R., McDermott, G. y Yu, E.W. (2006).** Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray

diffraction analysis of the regulator AcrR from *Escherichia coli*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 62, 1150-1152.

- **Lin, B., Van Verseveld, H.W. y Roling, W.F. (2002).** Microbial aspects of anaerobic BTEX degradation. Biomed Environ Sci 15, 130-144.
- **Linares, J.F., Moreno, R., Fajardo, A., Martínez-Solano, L., Escalante, R., Rojo, F. y Martínez, J.L. (2010).** The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol 12, 3196-3212.
- **Lochmeyer, C., Koch, J. y Fuchs, G. (1992).** Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-coenzyme A (CoA) and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. J Bacteriol 174, 3621-3628.
- **Löffler, C., Kuntze, K., Vazquez, J.R., Rugor, A., Kung, J.W., Böttcher, A. y Boll, M. (2011).** Occurrence, genes and expression of the W/Se-containing class II benzoyl-coenzyme A reductases in anaerobic bacteria. Environ Microbiol 13, 696-709.
- **López-Barragán, M.J., Carmona, M., Zamarro, M.T., Thiele, B., Boll, M., Fuchs, G., García, J.L. y Díaz, E. (2004a).** The *bzd* gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism, in *Azoarcus* sp. strain CIB. J Bacteriol 186, 5762-5774.
- **López-Barragán, M.J., Díaz, E., García, J.L. y Carmona, M. (2004b).** Genetic clues on the evolution of anaerobic catabolism of aromatic compounds. Microbiology 150, 2018-2021.
- **López-Sánchez, A., Floriano, B., Andújar, E., Hernáez, M.J. y Santero, E. (2010).** Tetralin-induced and ThnR-regulated aldehyde dehydrogenase and beta-oxidation genes in *Sphingomonas macrogoltabida* strain TFA. Appl Environ Microbiol 76, 110-118.
- **Lovley, D.R. (2001).** Bioremediation. Anaerobes to the rescue. Science 293, 1444-1446.
- **Lovley, D.R. (2003).** Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. Nat Rev Microbiol 1, 35-44.

- **Ma, Y.C., Funk, M., Dunham, W.R. y Komuniecki, R. (1993).** Purification and characterization of electron-transfer flavoprotein: rhodoquinone oxidoreductase from anaerobic mitochondria of the adult parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J Biol Chem* 268, 20360-20365.
- **Marqués, S., Aranda-Olmedo, I. y Ramos, J.L. (2006).** Controlling bacterial physiology for optimal expression of gene reporter constructs. *Curr Opin Biotechnol* 17, 50-56.
- **Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. y Hengge-Aronis, R. (1998).** Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigma s and requires activation by cAMP-CRP. *J Mol Biol* 276, 339-353.
- **Martín, A.C., López, R. y García, P. (1995).** Nucleotide sequence and transcription of the left early region of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage Cp-1 coding for the terminal protein and the DNA polymerase. *Virology* 211, 21-32.
- **Matsunaga, T., Okamura, Y., Fukuda, Y., Wahyudi, A.T., Murase, Y. y Takeyama, H. (2005).** Complete genome sequence of the facultative anaerobic magnetotactic bacterium *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *DNA Res* 12, 157-166.
- **Maxam, A.M. y Gilbert, W. (1980).** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65, 499-560.
- **McInerney, M.J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R.S., Ríos-Hernández, L., Sieber, J., Struchtemeyer, C.G., Bhattacharyya, A., Campbell, J.W., y Gunsalus, R. P. (2007).** The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7600-7605.
- **McLeod, M.P. y Eltis, L.D. (2008).** Genomic insights into the aerobic pathways for degradation of organic pollutants. p 1-23. En E. Díaz (ed.), *Microbial Biodegradation: genomics and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido.
- **Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N. y Fuchs, G. (2002).** Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds

- under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov. y *Azoarcus buckelii* sp. nov. Arch Microbiol 178, 26-35.
- **Milanesio, P., Arce-Rodríguez, A., Muñoz, A., Calles, B. y de Lorenzo, V. (2011).** Regulatory exaptation of the catabolite repression protein (Crp)-cAMP system in *Pseudomonas putida*. Environ Microbiol 13, 324-339.
  - **Miller, J.H. (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbord Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
  - **Miñambres, B., Martínez-Blanco, H., Olivera, E.R., García, B., Díez, B., Barredo, J.L., Moreno, M.A., Schleissner, C., Salto, F. y Luengo, J.M. (1996).** Molecular cloning and expression in different microbes of the DNA encoding *Pseudomonas putida* U phenylacetyl-CoA ligase. Use of this gene to improve the rate of benzylpenicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J Biol Chem 271, 33531-33538.
  - **Möbitz, H. y Boll, M. (2002).** A Birch-like mechanism in enzymatic benzoyl-CoA reduction: a kinetic study of substrate analogues combined with an ab initio model. Biochemistry 41, 1752-1758.
  - **Mohamed, M.el-S. y Fuchs, G. (1993).** Purification and characterization of phenylacetate-coenzyme A ligase from a denitrifying *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of phenylacetate. Arch Microbiol 159, 554-562.
  - **Mohamed, M.E., Zaar, A., Ebenau-Jehle, C. y Fuchs, G. (2001).** Reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. J Bacteriol 183, 1899-1908.
  - **Moore, W.E.C. (1966).** Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. Int J Syst Bacteriol 16, 173-190.
  - **Morales, G., Linares, J.F., Beloso, A., Albar, J.P., Martínez, J.L. y Rojo, F. (2004).** The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. J Bacteriol 186, 1337-1344.

- **Morales, G., Ugidos, A. y Rojo, F. (2006).** Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environ Microbiol* 8, 1764-1774.
- **Morasch, B., Schink, B., Tebbe, C.C. y Meckenstock, R.U. (2004).** Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch Microbiol* 181, 407-417.
- **Moreno-Ruiz, E., Hernáez, M.J., Martínez-Pérez, O. y Santero, E. (2003).** Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogoltabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol* 185, 2026-2030.
- **Moreno, R., Fonseca, P. y Rojo, F. (2010).** The Crc global regulator inhibits the *Pseudomonas putida* pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory and structural genes. *J Biol Chem* 285, 24412-24419.
- **Moreno, R. y Rojo, F. (2008).** The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 190, 1539-1545.
- **Müller, C., Petruschka, L., Cuypers, H., Burchhardt, G. y Herrmann, H. (1996).** Carbon catabolite repression of phenol degradation in *Pseudomonas putida* is mediated by the inhibition of the activator protein PhIR. *J Bacteriol* 178, 2030-2036.
- **Murray, D.S., Schumacher, M.A. y Brennan, R.G. (2004).** Crystal structures of QacR-diamidine complexes reveal additional multidrug-binding modes and a novel mechanism of drug charge neutralization. *J Biol Chem* 279, 14365-14371.
- **Natsume, R., Ohnishi, Y., Senda, T. y Horinouchi, S. (2004).** Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Biol* 336, 409-419.
- **Niemetz, R., Altenschmidt, U., Brucker, S. y Fuchs, G. (1995).** Benzoyl-coenzyme-A 3-monooxygenase, a flavin-dependent hydroxylase. Purification, some properties and its role in aerobic benzoate oxidation via gentisate in a denitrifying bacterium. *Eur J Biochem* 227, 161-168.



- **Nogales, J., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., García, J.L. y Díaz, E. (2005).** Molecular characterization of the gallate dioxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. The prototype of a new subgroup of extradiol dioxygenases. *J Biol Chem* 280, 35382-35390.
- **Noller, A.C., McEllistrem, M.C., Stine, O.C., Morris, J.G., Jr., Boxrud, D.J., Dixon, B. y Harrison, L.H. (2003).** Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41, 675-679.
- **Ohtsubo, Y., Goto, H., Nagata, Y., Kudo, T. y Tsuda, M. (2006).** Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Mol Microbiol* 60, 1563-1575.
- **Okada, U., Kondo, K., Hayashi, T., Watanabe, N., Yao, M., Tamura, T. y Tanaka, I. (2008).** Structural and functional analysis of the TetR-family transcriptional regulator SCO0332 from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64, 198-205.
- **Orth, P., Cordes, F., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. y Hinrichs, W. (1998).** Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *J Mol Biol* 279, 439-447.
- **Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. y Hinrichs, W. (2000).** Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* 7, 215-219.
- **Orth, P., Schnappinger, D., Sum, P.E., Ellestad, G.A., Hillen, W., Saenger, W. y Hinrichs, W. (1999).** Crystal structure of the tet repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)-6-demethyl-6-deoxy-tetracycline. *J Mol Biol* 285, 455-461.
- **Pan, C., Oda, Y., Lankford, P.K., Zhang, B., Samatova, N.F., Pelletier, D.A., Harwood, C.S. y Hettich, R.L. (2008).** Characterization of anaerobic catabolism of *p*-coumarate in *Rhodopseudomonas palustris* by integrating transcriptomics and quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 7, 938-948.

- **Parales, R.E. y Resnick, S.M. (2006).** Aromatic ring hydroxylating dioxygenases. p. 287-340. En J. L. Ramos and R. C. Levesque (eds.), *Pseudomonas* vol. 4: Molecular biology of emerging issues. Springer, Países Bajos.
- **Pelletier, D.A. y Harwood, C.S. (1998).** 2-Ketocyclohexanecarboxyl coenzyme A hydrolase, the ring cleavage enzyme required for anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 180, 2330-2336.
- **Pelletier, D.A. y Harwood, C.S. (2000).** 2-Hydroxycyclohexanecarboxyl coenzyme A dehydrogenase, an enzyme characteristic of the anaerobic benzoate degradation pathway used by *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 182, 2753-2760.
- **Peres, C.M. y Harwood, C.S. (2006).** BadM is a transcriptional repressor and one of three regulators that control benzoyl coenzyme A reductase gene expression in *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* 188, 8662-8665.
- **Peters, F., Rother, M. y Boll, M. (2004).** Selenocysteine-containing proteins in anaerobic benzoate metabolism of *Desulfococcus multivorans*. *J Bacteriol* 186, 2156-2163.
- **Peters, F., Shinoda, Y., McInerney, M.J. y Boll, M. (2007).** Cyclohexa-1,5-diene-1-carboxyl-coenzyme A (CoA) hydratases of *Geobacter metallireducens* and *Syntrophus aciditrophicus*: Evidence for a common benzoyl-CoA degradation pathway in facultative and strict anaerobes. *J Bacteriol* 189, 1055-1060.
- **Petruschka, L., Burchhardt, G., Muller, C., Weihe, C. y Herrmann, H. (2001).** The *cyo* operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* 266, 199-206.
- **Pflüger-Grau, K., Chavarría, M. y de Lorenzo, V. (2011).** The interplay of the EIIA(Ntr) component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS(Ntr)) of *Pseudomonas putida* with pyruvate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* DOI S0304-4165(11)00005-5 [pii].
- **Pflüger, K. y de Lorenzo, V. (2008).** Evidence of in vivo cross talk between the nitrogen-related and fructose-related branches of the carbohydrate phosphotransferase system of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 190, 3374-3380.

- **Philipp, B. y Schink, B. (1998).** Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. *J Bacteriol* 180, 3644-3649.
- **Prieto, M.A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Miñambres, B., García, J.L. y Díaz, E. (2004).** Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 28, 503-518.
- **Puigbó, P., Bravo, I.G. y García-Vallve, S. (2008).** E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics* 9, 65.
- **Rabus, R. (2005).** Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 580-587.
- **Rabus, R., Kube, M., Heider, J., Beck, A., Heitmann, K., Widdel, F. y Reinhardt, R. (2005).** The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183, 27-36.
- **Rabus, R. y Widdel, F. (1995).** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163, 96-103.
- **Rajan, S.S., Yang, X., Shuvalova, L., Collart, F. y Anderson, W.F. (2006).** Crystal structure of YfiR, an unusual TetR/CamR-type putative transcriptional regulator from *Bacillus subtilis*. *Proteins* 65, 255-257.
- **Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. y Tobes, R. (2005).** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 326-356.
- **Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., Gillis, M., Hoste, B., Vancanneyt, M., Kersters, K. y De Ley, J. (1993).** *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 43, 574-584.

- **Rey, F.E. y Harwood, C.S. (2010).** FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *Mol Microbiol* 75, 1007-1020.
- **Rieger, P.G., Meier, H.M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T. y Knackmuss, H.J. (2002).** Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotechnol* 94, 101-123.
- **Rojo, F. y Dinamarca, A. (2004).** Catabolite repression and physiological control, p. 365-387. En J.L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*, vol. 2. Virulence and gene regulation. Kluwer Academic Press, New York.
- **Rudolphi, A., Tschech, A. y Fuchs, G. (1991).** Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 155, 238-248.
- **Samanta, S.K. y Harwood, C.S. (2005).** Use of the *Rhodospseudomonas palustris* genome sequence to identify a single amino acid that contributes to the activity of a coenzyme A ligase with chlorinated substrates. *Mol Microbiol* 55, 1151-1159.
- **Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Cold Spring Harbor, Nueva York.
- **Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- **Sauer, R.T., Yocum, R.R., Doolittle, R.F., Lewis, M. y Pabo, C.O. (1982).** Homology among DNA-binding proteins suggests use of a conserved super-secondary structure. *Nature* 298, 447-451.
- **Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69-73.
- **Schink, B., Philipp, B. y Muller, J. (2000).** Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften* 87, 12-23.
- **Schuck, P., Perugini, M.A., Gonzales, N.R., Howlett, G.J. y Schubert, D. (2002).** Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* 82, 1096-1111.

- **Schuck, P. y Rossmannith, P. (2000).** Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers* 54, 328-341.
- **Schühle, K. y Fuchs, G. (2004).** Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 186, 4556-4567.
- **Schühle, K., Gescher, J., Feil, U., Paul, M., Jahn, M., Schägger, H. y Fuchs, G. (2003).** Benzoate-coenzyme A ligase from *Thauera aromatica*: an enzyme acting in anaerobic and aerobic pathways. *J Bacteriol* 185, 4920-4929.
- **Schühle, K., Jahn, M., Ghisla, S. y Fuchs, G. (2001).** Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*. *J Bacteriol* 183, 5268-5278.
- **Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A. y Brennan, R.G. (2001).** Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294, 2158-2163.
- **Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A. y Brennan, R.G. (2002).** Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J* 21, 1210-1218.
- **Sharp, P.M. y Li, W.H. (1987).** The codon Adaptation Index a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15, 1281-1295.
- **Shingler, V. (2003).** Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environ Microbiol* 5, 1226-1241.
- **Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H., Sakai, Y. y Kato, N. (2005).** Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 1483-1491.
- **Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. y Kato, N. (2004).** Aerobic and anaerobic toluene

degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl Environ Microbiol* 70, 1385-1392.

- **Silva-Rocha, R., Tamames, J., Dos Santos, V.M. y de Lorenzo, V. (2011).** The *logicome* of environmental bacteria: merging catabolic and regulatory events with Boolean formalisms. *Environ Microbiol*. DOI j.1462-2920.2011.02455.x.
- **Song, B., Haggblom, M.M., Zhou, J., Tiedje, J.M. y Palleroni, N.J. (1999).** Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3, 1129-1140.
- **Spiro, S. y Guest, J.R. (1990).** FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6, 399-428.
- **Spormann, A.M. y Widdel, F. (2000).** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11, 85-105.
- **Springer, N., Ludwig, W., Philipp, B. y Schink, B. (1998).** *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3, 953-956.
- **Sugiyama, M., Onaka, H., Nakagawa, T. y Horinouchi, S. (1998).** Site-directed mutagenesis of the A-factor receptor protein: Val-41 important for DNA-binding and Trp-119 important for ligand-binding. *Gene* 222, 133-144.
- **Suh, S.J., Runyen-Janecky, L.J., Maleniak, T.C., Hager, P., MacGregor, C.H., Zielinski-Mozny, N.A., Phibbs, P.V., Jr. y West, S.E. (2002).** Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 148, 1561-1569.
- **Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971).** Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* 39, 462-477.
- **Takenaka, S., Murakami, S., Shinke, R., Hatakeyama, K. y Aoki, K. (1997).** Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. *J Biol Chem* 272, 14727-14732.



- **Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- **Tovar, K., Ernst, A. y Hillen, W. (1988).** Identification and nucleotide sequence of the class E tet regulatory elements and operator and inducer binding of the encoded purified Tet repressor. *Mol Gen Genet* 215, 76-80.
- **Tropel, D. y van der Meer, J.R. (2004).** Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 474-500.
- **Unden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.G., Wackwitz, B. y Zeuner, Y. (2002).** Control of FNR function of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4, 263-268.
- **Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J. y Six, S. (1995).** O<sub>2</sub>-sensing and O<sub>2</sub>-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol* 164, 81-90.
- **Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T. y Eltis, L.D. (2006).** The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41, 241-267.
- **van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S., y Zehnder, A.J. (1992).** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev* 56, 677-694.
- **Velasco, A., Alonso, S., García, J.L., Perera, J. y Díaz, E. (1998).** Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. *J Bacteriol* 180, 1063-1071.
- **VerBerkmoes, N.C., Shah, M.B., Lankford, P.K., Pelletier, D.A., Strader, M.B., Tabb, D.L., McDonald, W.H., Barton, J.W., Hurst, G.B., Hauser, L., Davison, B.H., Beatty, J.T., Harwood, C.S., Tabita, F.R., Hettich, R.L., Larimer, F.W. (2006).** Determination and comparison of the baseline proteomes of the versatile microbe *Rhodospseudomonas palustris* under its major metabolic states. *J Proteome Res* 5, 287-298.

- **Verfürth, K., Pierik, A.J., Leutwein, C., Zorn, S. y Heider, J. (2004).** Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and *m*-xylene metabolism. *Arch Microbiol* *181*, 155-162.
- **Vogels, G.D. y Van der Drift, C. (1976).** Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriol Rev* *40*, 403-468.
- **Vollhardt, K.P. y Schore, N.E. (1994).** Organic Chemistry. Freeman and co. Nueva York.
- **Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M. y Barton, G.J. (2009).** Jalview Version 2 a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* *25*, 1189-1191.
- **Weissbach, H., Toohey, J. y Barker, H.A. (1959).** Isolation and properties of B(12) coenzymes containing benzimidazole or dimethylbenzimidazole. *Proc Natl Acad Sci U S A* *45*, 521-525.
- **Widdel, F. y Rabus, R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* *12*, 259-276.
- **Wilson, K. (1997).** Current Protocols in Molecular Biology. F. M. Ausubel (sd). John Wiley & Sons Inc., Nueva Jersey.
- **Wirth, R., Friesenegger, A. y Fiedler, S. (1989).** Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet* *216*, 175-177.
- **Wischgoll, S., Demmer, U., Warkentin, E., Gunther, R., Boll, M. y Ermler, U. (2010).** Structural basis for promoting and preventing decarboxylation in glutaryl-coenzyme a dehydrogenases. *Biochemistry* *49*, 5350-5357.
- **Wischgoll, S., Heintz, D., Peters, F., Erxleben, A., Sarnighausen, E., Reski, R., Van Dorsselaer, A. y Boll, M. (2005).** Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens*. *Mol Microbiol* *58*, 1238-1252.
- **Wischgoll, S., Taubert, M., Peters, F., Jehmlich, N., von Bergen, M. y Boll, M. (2009).** Decarboxylating and nondecarboxylating glutaryl-coenzyme A

dehydrogenases in the aromatic metabolism of obligately anaerobic bacteria. J Bacteriol 191, 4401-4409.

- **Wöhlbrand, L., Kallerhoff, B., Lange, D., Hufnagel, P., Thiermann, J., Reinhardt, R. y Rabus, R. (2007).** Functional proteomic view of metabolic regulation in "*Aromatoleum aromaticum*" strain EbN1. Proteomics 7, 2222-2239.
- **Yu, Z., Reichheld, S.E., Savchenko, A., Parkinson, J. y Davidson, A.R. (2010).** A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. J Mol Biol 400, 847-864.
- **Zhou, J., Fries, M.R., Chee-Sanford, J.C. y Tiedje, J.M. (1995).** Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth of toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 45, 500-506.
- **Ziegler, K., Buder, R., Winter, J. y Fuchs, G. (1989).** Activation of aromatic acids and aerobic 2-aminobenzoate metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* strain. Archives of Microbiology 151, 171-176.